

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RHIZOPUS ARRHIZUS'DAN KATI HAL FERMANTASYONU İLE
LİPAZ ÜRETİMİ**

116 668

Aysun ORHAN

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Tez Yöneticisi : Prof. Dr. Dursun ÖZER

2002

ELAZIĞ

116668



T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RHIZOPUS ARRHIZUS'DAN KATI HAL FERMANTASYONU
İLE LİPAZ ÜRETİMİ**

Aysun ORHAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Bu tez ,tarihinde aşağıda belirtilen jüri tarafından oybirliği/oyçokluğu ile başarılı / ~~başarısız~~ olarak değerlendirilmiştir.

İmza

(Danışman)

Prof. Dr. Dursun ÖZER



İmza

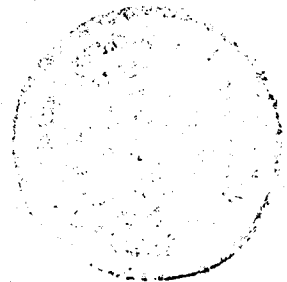
(Üye)

Yrd. Doç. Dr. Ceydet Akarman



İmza

(Üye)



**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

***RHIZOPUS ARRHIZUS*'DAN KATI HAL FERMANTASYONU İLE LİPAZ
ÜRETİMİ**

Aysun ORHAN

Fırat Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı
2002, Sayfa 87

Bu çalışmada temel olarak küf türünden olan *Rhizopus arrhizus*'dan katı hal fermantasyonu ile lipaz üretimi için gerekli proses şartları incelenmiştir. Çalışmanın ilk aşamasında karbon kaynağı olarak sadece ticari önemi olmayan fakat besin değeri fazla olan buğday kepeği kullanılmıştır. En yüksek enzim aktivitesi %5 kepek konsantrasyonu, 0.3 mm kepek boyutu ve pH=6.67'de (doğal pH) 751.9 $\mu\text{mol/L.dak.}$ olarak elde edilmiştir. Daha sonra lipaz üretimine başlangıç mikroorganizma konsantrasyonunun, karıştırma hızının etkisi ve buğday kepeği ortamına çeşitli katkı maddelerinin (mısır özü yağı, glikoz, yeast ekstrakt, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 ve KH_2PO_4) etkisi incelenmiştir.

Çalışmanın ikinci yarısında ise karbon kaynağı olarak yine ticari öneme sahip olmayan ay çekirdeği küspesi kullanılmıştır. En yüksek enzim aktivitesi %5 ay çekirdeği küspesi konsantrasyonu, 0.15 mm ay çekirdeği küspesi boyutu ve pH=6.67'de (doğal pH) 625.175 $\mu\text{mol/L.dak.}$ olarak elde edilmiştir. Buğday kepeğinde yapılan diğer çalışmalar ay çekirdeği küspesinde de denenmiştir.

Üretilen lipazı analiz etmek için sıcaklık, pH ve karıştırma hızının kontrol edilebileceği 30 ml çalışma kapasiteli bir karıştırmalı kap kullanılmıştır. Hidroliz tepkimesi, pH-stat metoduna göre yani pH değeri sabit tutulan tepkime ortamında, tributirinin lipaz tarafından hidrolizi sonucunda oluşan yağ asitlerini nötrleştirmek için harcanan NaOH miktarının zamana karşı ölçülmesiyle izlenmiştir. Bu izlenim Optimum pH: 6 ve sıcaklık: 35°C'de yapılmıştır.

Anahtar Kelimeler : *Rhizopus arrhizus*, Lipaz Enzimi, Katı Hal Fermantasyonu, Buğday Kepeği, Ay Çekirdeği Küspesi.



SUMMARY

Master Thesis

**LIPASE PRODUCTION FROM *RHIZOPUS ARRHZUS* WITH SOLID STATE
FERMENTATION**

Aysun ORHAN

University of Firat

Graduate School of Natural and Applied Science

Department of Chemical Engineering

2002, Page 87

In this study, some process conditions for lipase production by *Rhizopus arrhizus* were investigated using solid-state fermentation technique. In the first part of the study, wheat bran which is nutritionally rich but is not important commercially was used as a carbon source. The highest lipolytic activity reached was 752 $\mu\text{mole/L.min.}$ which was obtained in the presence of 5 % (w/v) wheat bran, with a particle size of 0.3 mm and at pH: 6.67. The effects of initial spore concentration and agitation rate on lipase production were also studied. Having found the optimum process conditions, fermentation medium was supplemented with some chemicals such as corn oil, glucose, yeast extract, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 and KH_2PO_4 in order to improve lipase production.

In the second part of the work, sun flower waste was used as a solid substrate. The maximum enzyme activity (625.175 $\mu\text{mole/L.min.}$) was obtained at 5 % (w/v) waste concentration using 0.15 mm particle size. In order to get comparable results, similar parameters were investigated in the precense of sun flower oil waste.



In order to measure the activity of lipase produced, a 30 ml working capacity reactor with pH, temperature and agitation control was used throughout the experiments. The activity of lipase was determined by titrimetric method in which a certain amount of NaOH was used to neutralise the fatty acids released during the hydrolysis.

Key words: *Rhizopus arrhizus*, Lipase Enzyme, Solid State Fermentation, Wheat Bran, Sun Flower Pulp.



TEŞEKKÜR

Tez konumun seçiminde, planlanmasında ve sonuçların değerlendirilmesinde büyük yardımlarını gördüğüm değerli hocam Prof. Dr. Dursun ÖZER'e, çalışmalarım sırasında her türlü konuda destek sağlayan sayın Doç. Dr. Murat ELİBOL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca çalışmalarımın yürütülmesi için maddi destek sağlayan Fırat Üniversitesi Araştırma Fonuna ve her türlü imkanı sağlayan Fırat Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümüne teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında maddi ve manevi desteğini gördüğüm eşim Uzman Ramazan ORHAN'a teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET	I
SUMMARY.....	III
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
ŞEKİLLER.....	IX
TABLolar	XIII
1. GİRİŞ	1
2. MİKROORGANİZMALAR.....	3
2.1. Genel	3
2.2. Canlı Varlıkların Sınıflandırılması	3
2.3. Fermantasyonda Kullanılan Mikroorganizmalar.....	5
2.4. Küf Mantarları	5
2.4.1. <i>Rhizopus</i>	6
3. ENZİMLER.....	7
3.1. Genel.....	7
3.2. Kimyasal Yapı	8
3.3. Enzim Etkin Bölgesi ve Enzim-Substrat Etkileşimi	9
3.4. Enzimli Tepkimelerin Kinetiği	12
3.4.1. Tek Etkin Bölgesi Enzimler İçin Türetilen Henry-Michaelis-Menten ve	
Briggs-Haldene Eşitliği	12
3.4.2. Başlangıç Tepkime Hızının Substrat Konsantrasyonu ile Değişim Modelleri ..	14
3.4.3. Gerileticiler ve Enzim Deaktivasyonu	16
3.5. Enzim Aktivitesini Etkileyen Parametreler	17
3.5.1. Sıcaklığın Etkisi	17

3.5.2. pH'nin Etkisi	18
3.5.3. Substrat Konsantrasyonunun Etkisi.....	18
3.5.4. Enzim Konsantrasyonunun Etkisi.....	19
3.6. Enzim Üretimi	20
3.6.1. Mikrobiyal Enzim Üretimi	21
4. LİPAZLAR.....	22
4.1. Genel	22
4.2. Lipaz Kaynakları.....	22
4.3. Lipazın Kullanım Alanları.....	23
4.4. Lipazların Katalizleyici Özellikleri.....	23
4.5. Aktivatörler.....	24
4.6. Tepkimeyi İzleme Yöntemleri.....	26
4.6.1. Trigliserid Azalma Hızının Saptanması	26
4.6.2. Yağ Asidi Artım Hızının Ölçülmesi.....	26
4.7. Aktivite ve Birimler	27
4.8. Substrat Seçimi	28
5. KATI HAL (SOLID-STATE) FERMANTASYONU (KHF)	29
5.1. Katı Hal Fermantasyonuyla Lipaz Üretimi Alanında Yapılan Bazı Çalışmalar	33
6. MATERYAL VE METOTLAR.....	35
6.1. <i>Rhizopus Arrhizus</i> 'un İnkübasyonu	35
6.2. Fermantasyon Ortamı.....	36
6.2.1. Buğday Kepeği Kullanılarak Enzim Üretimi.....	36
6.2.2. Ay Çekirdeği Küspesi Kullanılarak Enzim Üretimi	36
6.3. Analitik Ölçüm Metotları	37
6.3.1. Enzim Aktivitesi.....	37
6.4. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	38
7. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	39
7.1. Buğday Kepeği	39

7.1.1. Kepek Boyutunun Etkisi.....	39
7.1.2. Kepek Konsantrasyonunun Etkisi.....	41
7.1.3. Başlangıç pH'sının Etkisi	43
7.1.4. Başlangıç Spor Konsantrasyonunun Etkisi.....	46
7.1.5. Karıştırma Hızının Etkisi.....	48
7.1.6. Kepek Ortamına Katkı Maddeleri İlavesi.....	50
7.1.6.1. Glikoz İlavesinin Etkisi.....	50
7.1.6.2. Yeast Ekstrakt İlavesinin Etkisi	51
7.1.6.3. İndükleyici Etkisi.....	51
7.1.6.4. K_2HPO_4 ve KH_2PO_4 İlavesinin Enzim Üretimi Üzerine Etkisi	53
7.1.6.5. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ İlavesinin Enzim Üretimi Üzerine Etkisi.....	53
7.2. Ay Çekirdeği Küspesi	54
7.2.1. Ay Çekirdeği Küspesi Boyutlarının Enzim Üretimi Üzerine Etkisi	54
7.2.2. Ay Çekirdeği Küspesi Konsantrasyonunun Etkisi.....	56
7.2.3. Farklı Başlangıç pH'sının Etkisi	58
7.2.4. Farklı Başlangıç Spor Konsantrasyonunun Etkisi.....	60
7.2.5. Karıştırma Hızının Enzim Üretimine Etkisi	62
7.2.6. Ay Çekirdeği Küspesi Ortamına Katkı Maddeleri İlavesi.....	64
7.2.6.1. Glikoz İlavesinin Etkisi.....	64
7.2.6.2. Yeast Ekstrakt İlavesinin Etkisi	65
7.2.6.3. K_2HPO_4 ve KH_2PO_4 İlavesinin Etkisi	65
7.2.6.4. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ İlavesinin Etkisi.....	66
7.3. Genel Sonuçlar.....	67
8. KAYNAKLAR	69
9. EKLER	73



ŞEKİLLER

Sayfa No

Şekil 2.1. Biyokimya mühendisliğinde mikroorganizmaların sınıflandırılması	5
Şekil 3.1. Anahtar ve kilit modeli.....	11
Şekil 3.2. Uyarılmış biçimleme modeli	11
Şekil 3.3. Substrat konsantrasyonu ile başlangıç tepkime hızının iki farklı özellikteki enzim için değişimi.....	14
Şekil 3.4. Başlangıç substrat konsantrasyonuna karşı tepkime hızının Lineweaver-Burk formunda grafiğe geçirilmesi sonucu K_m ve V_{max} 'ın bulunması.....	15
Şekil 3.5. Enzim tepkimesinin hızı ile sıcaklık arasındaki değişim	17
Şekil 3.6. Enzimatik bir tepkimenin hızı ile pH arasındaki bağıntı ve optimum pH ..	18
Şekil 3.7. Substrat konsantrasyonu ile tepkime hızı arasındaki değişim.....	19
Şekil 3.8. Enzim aktivitesi üzerine enzim konsantrasyonunun etkisi	19
Şekil 6.2. Enzim aktivitesi ölçmek için kullanılan sistem.....	37
Şekil 7.1. Farklı kepek boyutlarında enzim üretiminin zamanla değişimi	40
Şekil 7.2. Farklı kepek boyutlarında ortam pH'sının zamanla değişimi	40
Şekil 7.3. Farklı kepek boyutlarındaki maksimum enzim üretimi	41
Şekil 7.4. Farklı kepek konsantrasyonlarında enzim üretiminin zamanla değişimi....	42
Şekil 7.5. Farklı kepek konsantrasyonlarında ortam pH'sının zamanla değişimi.....	42
Şekil 7.6. Buğday kepeği konsantrasyonu ile maksimum maksimum aktivite değerlerinin değişimi.....	43
Şekil 7.7. Farklı başlangıç pH'larında enzim üretiminin zamanla değişimi.....	44
Şekil 7.8. Buğday kepeği için farklı başlangıç pH'larında ortam pH'sının zamanla değişimi.....	45
Şekil 7.9. Buğday kepeği için farklı başlangıç pH'larında maksimum enzim üretimi.	45
Şekil 7.10. Kepek için farklı başlangıç spor kons.'larında enzim üretiminin zamanla değişimi.....	46
Şekil 7.11. Kepek için farklı başlangıç spor kons.'larında maksimum enzim üretimi..	47
Şekil 7.12. Buğday kepeği için farklı başlangıç spor kons.'larında ortam pH'sının zamanla değişimi	47

Şekil 7.13. Buğday kepeği için farklı karıştırma hızlarında enzim miktarının zamanla değişimi.....	48
Şekil 7.14. Kepek için farklı karıştırma hızlarında ortam pH'sının zamanla değişimi .	49
Şekil 7.15. Kepek için farklı karıştırma hızlarının maksimum aktivite değerleri.....	49
Şekil 7.16. Farklı glikoz konsantrasyonlarında enzim üretiminin zamanla değişimi ...	50
Şekil 7.17. Farklı yeast ekstrakt konsantrasyonlarında enzim üretiminin zamanla değişimi	51
Şekil 7.18. Farklı sıvı mısır özü yağı konsantrasyonlarında enzim üretiminin zamanla değişimi.....	52
Şekil 7.19. Farklı K_2HPO_4 ve KH_2PO_4 konsantrasyonlarında enzim üretiminin zamanla değişimi.....	53
Şekil 7.20. Farklı $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ konsantrasyonlarında enzim üretiminin zamanla değişimi	54
Şekil 7.21. Farklı ay çekirdeği küspesi boyutlarında enzim üretiminin zamanla değişimi	55
Şekil 7.22. Farklı ay çekirdeği küspesi boyutlarında maksimum enzim üretimi	55
Şekil 7.23. Farklı ay çekirdeği küspesi boyutlarında ortam pH'sının zamanla değişimi	56
Şekil 7.24. Farklı ay çekirdeği küspesi konsantrasyonlarında enzim üretiminin zamanla değişimi.....	57
Şekil 7.25. Farklı ay çekirdeği küspesi konsantrasyonlarında ortam pH'sının zamanla değişimi.....	57
Şekil 7.26. Farklı ay çekirdeği küspesi konsantrasyonlarında maksimum enzim Üretimi.....	58
Şekil 7.27. Ay çekirdeği küspesi için farklı başlangıç pH'larında enzim üretiminin zamanla değişimi.....	59
Şekil 7.28. Ay çekirdeği küspesi için farklı başlangıç pH'larında maksimum enzim üretimi	59
Şekil 7.29. Ay çekirdeği küspesi için farklı başlangıç pH'larında ortam pH'sının zamanla değişimi.....	60
Şekil 7.30. Ay çekirdeği küspesi için farklı spor konsantrasyonlarında enzim üretiminin zamanla değişimi.....	60

Şekil 7.31. Ay çekirdeği küspesi için farklı spor konsantrasyonlarında maksimum enzim üretimi	61
Şekil 7.32. Ay çekirdeği küspesi için farklı spor konsantrasyonlarında ortam pH'sının zamanla değişimi.....	61
Şekil 7.33. Ay çekirdeği küspesi için farklı karıştırma hızlarında enzim miktarının zamanla değişimi.....	62
Şekil 7.34. Ay çekirdeği küspesi için farklı karıştırma hızlarında maksimum enzim Aktiviteleri.....	63
Şekil 7.35. Ay çekirdeği küspesi için farklı karıştırma hızlarında ortam pH'sının zamanla değişimi.....	63
Şekil 7.36. Farklı glikoz konsantrasyonlarında enzim üretiminin zamanla değişimi ...	64
Şekil 7.37. Farklı yeast ekstrakt konsantrasyonlarında enzim üretiminin zamanla değişimi	65
Şekil 7.38. Farklı K_2HPO_4 ve KH_2PO_4 konsantrasyonlarında enzim üretiminin zamanla değişimi.....	66
Şekil 7.39. Farklı $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ konsantrasyonlarında enzim üretiminin zamanla değişimi	66

TABLOLAR

Sayfa No

Tablo 6.1. <i>R. arrhizus</i> için agarlı besi yeri bileşimi	35
--	----



1. GİRİŞ

Enzimler çok uzun zamanlardan beri hem insan besinlerinin hazırlanmasında hem de endüstriyel uygulamalarda yaygın bir şekilde kullanılmıştır. Ayrıca teşhis ve tedavi amacıyla kullanılan enzimlerin yeni özellikleri belirlendikçe ve teknolojik gelişmelere paralel olarak uygulama alanları hızla artmaktadır.

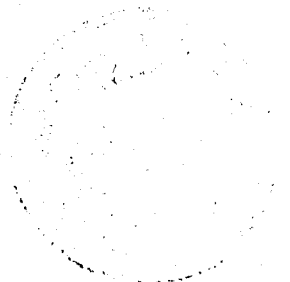
Enzimler düşük etkileşme enerjisi gösterdiklerinden, bir çok biyokimyasal tepkimeyi düşük sıcaklık ve basınçta yürütebilmektedirler. Tepkiyenlere karşı yüksek spesifiklik gösterdiklerinden tepkime sonucunda yan ürünler oluşturmamakta veya çok az oluşmaktadır. Bu nedenle enzimlerin kullanıldığı proseslerde kimya sanayindeki saflaştırma işlemlerine gerek kalmamaktadır.

Dünyada üretilen enzimlerin yaklaşık % 80'ni mikrobiyal kaynaklardan elde edilmektedir. Mikroorganizmalarda ise bu amaçla mantarlar ve bakteriler kullanılmaktadır. Bunların yanında bazı özel enzimlerin elde edilebilmesi için hayvansal ve bitkisel dokularla diğer mikroorganizmalarda kullanılmasına rağmen bunlar endüstriyel boyutta üretilmemektedir.

Genellikle küflerden elde edilen lipazlar, trigliseridleri digliseridlere, monogliseridlere, gliserin ve yağ asitlerine hidrolizini katalizleyen ve ayrıca belli şartlar altında ters tepkimeyi yani gliserin ve yağ asitlerinden trigliseridleri oluşturan biyolojik katalizörlerdir. Günümüzde biyoteknolojinin sürekli yeni arayışlar ve mevcut prosesleri geliştirme çabası içerisinde olması, mikrobiyal kaynaklı lipaz üretimine de bir hız kazandırmıştır. Süt ve sütü ürünler, çok çeşitli gıda maddeleri, kozmetik, deterjan gibi önemli ticari proseslerde lipaz kullanılması, araştırmacıları bu tür enzimlerin yer alacağı başka uygulama alanlarını arama çalışmalarına itmiştir. Yeni uygulama alanları ile artacak olan bu lipaz talebini karşılamak için de bol ve ekonomik sınırlar içinde üretilen proseslere ihtiyaç vardır.

Endüstriyel lipaz üretimi, fermantasyonda seçilecek besi yeri ve bileşenlerinden önemli ölçüde etkilenecektir. Özellikle, katı hal fermantasyonu (KHF) ile ticari önemi pek fazla olmayan ancak besin değeri yüksek olan maddelerin besi ortamında kullanılması ile lipaz üretimi artırılabilceği gözlenmiştir. Katı hal fermantasyonu katı

yada yarı katı substrat veya inert bir destek maddesi kullanılarak geliştirilen ve gelecek vaat eden yeni bir fermantasyon türüdür (Aidoo, 1982). Pirinç kabuğu, buğday kepeği, ay çekirdeği küspesi, sebze ve meyve artıkları gibi ekonomik değeri düşük ancak mikroorganizmalar için karbon kaynağı bakımından zengin olan maddeler kullanılır. Yeni olan bu tekniğin modifiye edilmesi ile üretim maliyeti önemli ölçüde düşürülebilir (Hang, 1989). Bunun yanında karbon kaynağı olarak kullanılan bir çok ham ve atık madde mikroorganizmaların yaşamaları için gerekli enerji ve besini sağlarken, çeşitli kentsel, tarımsal ve endüstriyel atıkların bu amaçla kullanılması ile bir yandan da çevre kirliliği önlenmiş olur.



2. MİKROORGANİZMALAR

2.1. Genel

Fermantasyon teknolojisinde ve buna bağımlı olarak da biyokimya mühendisliğinde kullanılan ana maddelerden biri kuşkusuz mikroplardır. Mikropların yetiştirilmesi, geliştirilmesi, fonksiyonlarının aydınlatılması, işlem için uygun mutantların seçilmesi mikrobiyal genetikle uğraşan araştırmacıları ilgilendirir.

Çok eskilerde canlılar, bitkisel ve hayvansal olmak üzere iki kısım altında toplanıyordu. Ancak, 1866 yılında ünlü Alman biyologu Ernest Hackel, mikroskop altında gözlenebilen ve bitki yada hayvansal özellikte oldukları kestirilemeyen üçüncü bir canlıların varlığından söz etmiş ve bunlara “protista” adını vermiştir. Hücresel yapıların daha iyi anlaşılmasından sonra bazı organizmalarda hücresel farklılıklar (örneğin çekirdek zarının olmayışı gibi) gözlenmiş ve bunlar da “monera” grubu altında toplanmıştır.

2.2. Canlı Varlıkların Sınıflandırılması

1. Monera

- a) Bakteriler, virüsler, bakteriyofajlar (Schizophyta)
- b) Mavi-yeşil algler (Cyanophyta)

2. Protista

- a) Algler
- b) Mantarlar (Fungi yada funguslar)

Mayalar ve aktinomisetler de bu gruba girer.

- c) Küfler (Myxomycetes)
- d) Tek hücreli hayvanlar (Protozoa)

3. Bitkiler (Metaphyto)

Protistaların dışında kalan tüm bitkisel canlılar bu gruba girer.

4. Hayvanlar (Metazoa)

Protistaların dışında kalan tüm hayvansal canlılar da bu sınıfa girer.

Biyokimya mühendisliğinde birinci ve ikinci gruba giren küçük canlılar önem taşımaktadır. Bunlar için genel olarak “mikroorganizma” adı verilmektedir.

Mikroorganizmalar ancak mikroskopla görülebilirler ve genellikle tek hücrelidirler. Ayı ayrı ya da koloniler halinde yaşarlar. Doğada yaygın olarak hemen her yerde; toprakta, suda, havada, çeşitli gıda maddelerinde, insan ve hayvanların cilt, deri ve bağırsaklarında bulunurlar.

Yapılarında, virüsler hariç, bütün mikroorganizmalar % 80 su içerirler. Bakteri, maya ve tek hücreli alglerin kuru ağırlıklarının %50'si proteindir. Mantarlar gibi daha karmaşık mikroorganizmaların hücre duvarını oluşturan inert polisakkarit bileşikler kuru ağırlığının büyük bir oranını oluştururlar. Bazı virüsler hariç bütün mikroorganizmaların diğer bir önemli bileşini de lipitlerdir.

Mikroorganizmalar da başka canlılar gibi çevrelerinin etkisindedirler ve uygun koşullarda büyürler, çoğalırlar. Uygun olmayan koşullarda ise üreyemezler, ya ölürler ya da bu koşullarda dayanabilecek şekiller oluştururlar. Sıcaklık, basınç, ortam pH'sı, nemlilik, oksijen ve çeşitli kimyasalların mikroorganizmaların üreme ve çalışmaları üzerine çok ve çeşitli etkileri bulunmaktadır (Pekin, 1980).

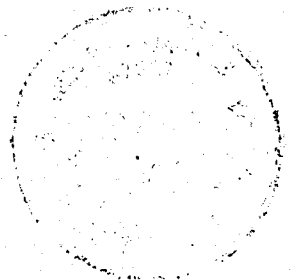
Kullandıkları besin yönünden de organizmalar iki gruba ayrılır.

1. Ototroflar (Autotrophs)

Bu canlılar inorganik hammadde kullanarak organik maddeleri oluştururlar. Örneğin, alg ve yeşil bitkilerde olduğu gibi fotosentez yoluyla CO_2 ve H_2O 'dan yararlanma.

2. Heterotroflar (Heterotrphs)

Hayvanlar, bir çok bakteriler, mantarlar, protozoalar gibi, daha önce oluşmuş organik maddelere gereksinme duyan canlılar bu sınıfa girerler.



Enerji kaynağı olarak güneş ışığını yada kimyasal maddeleri kullanmaları yönünden de canlılar fototrof (phototroph) ve kemotrof (chemotrph) şeklinde sınıflandırılmaktadır. Bu sınıflandırmaya göre inorganik madde kullananlarda kelime arasına “litho” ; organik madde kullananlarda ise “organo” ekleri getirilir.

2.3. Fermantasyonda Kullanılan Mikroorganizmalar

Fermantasyon ve atık suların arıtılmasında rol oynayan mikroorganizmalar Şekil 2.1'e göre sınıflandırılır.

2.4. Küf Mantarları

Besin maddeleri üzerinde beyaz yada renkli görünümleriyle dikkati çekerler. Saprofit, parazit yada simbiyotik olarak yaşarlar. Tek ya da çok hücreli sporlar aracılığıyla çoğalırlar. Küf mantarları heterotrofturlar. Yani kendileri sentez yapamadıkları için daha önce oluşmuş organik maddelere gereksinme duyarlar. Karbon kaynağı olarak birçok organik bileşiği kullanabilirler. Karbon kaynağı kullanımları seçimlidir. Örneğin besin ortamında glikoz ve asetik asit bulunuyorsa önce asetik asidi sonra glikozu harcarlar. Laktozu kullananlara çok ender rastlanır. Genellikle glikoz, sakkaroz ve maltozu tercih ederler. Hidrolitik enzim içerenler nişasta, dekstrin gibi



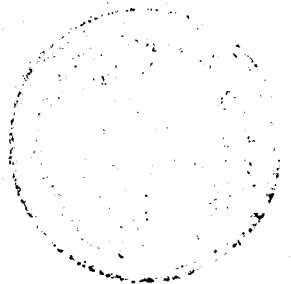
Şekil 2.1. Biyokimya mühendisliğinde mikroorganizmaların sınıflandırılması

maddeleri de besin olarak kullanabilirler. En çok amonyum azotunu, bazı ender türleri ise nitrat ve nitrit azotlarını kullanabilirler. Protein, pepton, aminoasitler ve üre gibi azot kaynaklarından türlerinin tümü yararlanabilir. Bunların dışında çeşitli mineral maddelere ve vitamin gibi gelişme faktörlerine gereksinimleri vardır. Türlerine göre optimum gelişme sıcaklıkları değişmektedir. Küf mantarları aerob olduklarından yüzeylerde gelişirler. Bazı türlerin miselleri substrat içlerinde de gelişebilmektedir. Bu türlerden “rokfor” türü peynirlerin üretilmesinde yararlanılmaktadır. Optimum pH’lar da türlere göre değişik değerler almaktadır. Küf mantarlarının fermentasyon teknolojisinde çok önemli yerleri vardır. Örneğin, *Rhizopus nigricans* fumarik asit üretiminde, *Thamnidium* ve *Absidia* stereoid dönüşümlerinde, *Aspergillus* sitrik, glukonik ve okzalikasit üretiminde ayrıca pek çoğu da değişik enzimleri (*Rhizopus arrhizus*’dan lipaz eldesi vb.) elde etmek amacıyla kullanılmaktadır (Pekin, 1980; Pamir, 1978; Bailey ve Ollis, 1977; Köşker, 1980).

Küf mantarları, ince ve bölmeli borucuklardan (hyphe) oluşurlar. Hifler, bölmeli (septa) veya birleşik olabilir. Hiflerin dallanma ve topluluklarıyla misel (mycelium) denen oluşumlar meydana gelir. Hifler yalnız fungusun temel ünitesi değil, aynı zamanda besin sağlama yerleridir. Organizma ve dokular içine girerek, salgıladıkları enzimlerle büyük organik molekülleri parçalayıp sindirirler (Aktan, 1981).

2.4.1. *Rhizopus*

Bu tür meyve, sebze ve diğer birçok gıdalarda bozulmalara yol açarlar. Gıda ve besiyerleri üzerinde çok çabuk gelişirler ve pamuk yığını halinde bir görünüm alırlar. Hifleri septumsuzdur. Sporangioforların çıkmış olduğu bölgede, besiyeri içine ve “rizoid” denilen kökçükler bulunur. Rizoidler arasında kalan hif kısmına “stolon” adı verilir. Sporangioforların ucunda kolumella ve bunu çevreleyen sporangiumlar vardır. Sporangiumlar büyük ve genellikle siyahtır.



3. ENZİMLER

3.1. Genel

Biyolojik sistemlerde meydana gelen tepkimeler laboratuvar koşullarında oluşturulmak istendiğinde çok yüksek sıcaklık, basınç gibi fizikokimyasal yöntemlerin uygulanması gerekir. Bu şartlarda bile tepkimelerin birçoğu izlenemeyecek kadar yavaştır. Örneğin, karbonhidrat, lipit ve proteinler ancak derişik asidik yada bazik çözeltilerde kaynatılarak hidroliz edilebilmesine karşın bu maddeler sindirim sisteminde çok daha kolay koşullarda (örneğin 37°C'de) hidroliz edilebilirler. Biyolojik sistemlerdeki tepkimelerin böylesine kolay ve hızlı oluşu "enzim" adı verilen biyolojik katalizörlerle gerçekleştirilebilmektedir. Enzim, canlı hücreler tarafından oluşturulan fakat etki yapabilmesi için hücreye ihtiyaç göstermeyen ısıya dayanıksız organik katalizörlerdir.

Enzimler, sarmal biçimde kıvrılmış yüksek molekül ağırlıklı proteinlerdir. Enzim molekülünü oluşturan aminoasit monomerlerinin sayısı ve diziliş her enzimin kendine özgü yapısını belirler. Kimyasal yapı olarak protein özelliğindeki enzimlerin en belirgin fonksiyonu canlı bir hücrede oluşan kimyasal tepkimeleri katalizlemeleridir. Katalizleme olayı, enzimin üzerinde bulunan ve etkin bölge olarak bilinen çok küçük bir bölge tarafından gerçekleştirilir. Katalizleme sırasında substrat molekülleri etkin bölgeye bağlanır. Maksimum katalitik etki, bu bölgede bulunan fonksiyonel grupların en uygun konuma gelmesiyle gerçekleşir.

Enzim etkin bölgesinin bu özel geometrik biçimleniş, birçok enzime dönüştürdükleri substrat için spesifik olma özelliği kazandırır. Bu özellikleri yanında, enzimler çok düşük sıcaklıkta ve atmosferik basınç altında kimyasal dönüşümleri, yüksek bir katalitik etki ile gerçekleştirirler. Enzim etkinliği, tepkime ortamı koşullarına (sıcaklık, pH, mekanik kuvvetler, etkinleştirici (aktivatör) ve geriletici (inhibitör), kimyasal maddeler vb.) bağlı olarak değişim gösterirler.

Bütün enzimler canlı kaynaklardan elde edilir. Enzimlerin eldesinde bitkisel ve hayvansal dokulardan veya mikroorganizmalardan yararlanılır. Günümüzde özellikle



ilaç ve besin endüstrisinde kullanılan enzimlerin büyük çoğunluğu uygun mikroorganizmalardan üretilmektedir (Bailey ve Ollis, 1977).

Endüstriyel ölçülerde kullanılan enzimler arasında en önemli yeri hidroliz enzimleri almaktadır. Hidroliz tepkimesi sonucu şeker, nişasta protein ve diğer organik maddeler bozunarak küçük moleküllere dönüştürülmektedir. Son yıllarda, enzim benzeri sentetik polimerlerin kimyasal dönüşümlerde kullanılması amacına yönelik laboratuvar düzeyinde araştırmalar yapılmaktaysa da önemli endüstriyel uygulama henüz gerçekleşmemiştir (Roberts, 1977).

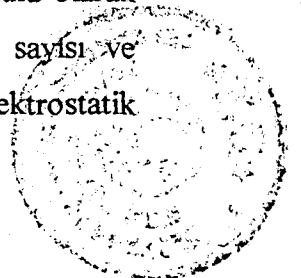
Kimyasal tepkimelerde olduğu gibi enzim tepkimeleri de iki genel yaklaşımla incelenebilir. Bunlardan birincisi, tepkimelerin ilerleme yönünü, substrat ve ürünlerin denge durumunda konsantrasyonlarını, bileşenlerin serbest enerji değişimlerinden yararlanarak saptanmasında temel olan “termodinamik yaklaşım”dır. Bu yaklaşımda tepkimenin denge durumuna nasıl ve hangi hızla ulaştığı sorusunun cevaplandırılması imkansızdır. Tepkimenin nasıl ve hangi hızla geliştiğini ve tepkime hızını etkileyen parametrelerin incelenmesini temel alan “kinetik yaklaşım” la tepkime mekanizması ayrıntılı bir şekilde ortaya konulabilir (Roberts, 1977).

Enzimlerin çoğu sadece belirli özelliklere sahip bileşiklere karşı etki gösterirler. Aynı bileşiğin çok küçük bir yapısal değişikliğe uğraması bile etkinliği bozabilir. Bir enzimin ancak belli bir nitelikteki tepkiyi dönüştürebilmesine “spesifiklik” adı verilir.

Her ne kadar enzimler katalizör ise de bazı yönleriyle diğer katalizörlerden ayrılırlar. Diğer katalizörler çok çeşitli tepkimeleri katalize ettikleri halde enzimler ancak belirli maddeler üzerinde etki gösterirler.

3.2. Kimyasal Yapı

Enzim molekülü, birbirine peptid bağlarıyla bağlanmış aminoasit moleküllerinden oluşan biyolojik bir polimerdir. Bu nedenle, enzim moleküllerine belirli bazı biyokimyasal tepkimeleri katalizleyebilecek özellikleri olan bir protein molekülü olarak bakılabilir. Enzimlerin katalitik etkileri, molekülü oluşturan aminoasitlerin sayısı ve diziliş sırasına, aminoasit zincirinin hidrojen bağları, hidrofobik bağlar, elektrostatik



çekim kuvveti ve disülfid bağları tarafından oluşturulan üç boyutlu sarmal yapısına ve etkin bölge olarak bilinen bölgesindeki fonksiyonel grupların özelliklerine bağlıdır.

Enzimlerin yapısında genel olarak bileşimce ve ödevce farklı olan iki kısım bulunur. Bunlardan birine “apoenzim” diğerine de “kofaktör” (bazı hallerde koenzim) adı verilir. Bunların her ikisine birden “haloenzim” de denilmektedir. Saf haldeki enzimlerin mikroskop, elektron mikroskobu ve x ışınları spektroskopisi yöntemleriyle incelenmesi sonucunda bunların farklı yapıda katı ve kristal özellikte oldukları saptanmıştır.

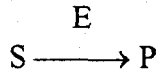
Enzimlerin apoenzim kısmı büyük protein moleküllerinden oluşmuştur. Apoenzim protein yapısı yani proteinler içindeki aminoasitlerin türleri ve dizilişleri enzimden enzime değişir. Bu nedenle enzimin özelliğini ve spesifikliğini sağlayan kısım apoenzimdir.

Bir kısım enzimler sadece proteinden oluştuğu halde bir kısım da metal iyonlarını da içerirler ve konjuge protein yapısındadırlar. Protein olmayan kısım prostetik grup, katalitik etkiden sorumludurlar. Ancak enzim etkisi için protein kısmına da ihtiyaç vardır.

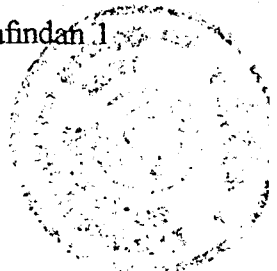
Apoenzime katalitik etki özelliği veren kısım kofaktördür. Apoenzimler yalnız başına hiçbir katalitik etki göstermezler. Kofaktörlerin ise yalnız oldukları zaman çoğunlukla enzime kıyasla çok düşük, bazı hallerde hiç katalitik etkileri yoktur. Ancak bir apoenzimle kofaktör bir arada olduğu zaman gerçek etkisi gözlenebilir.

3.3. Enzim Etkin Bölgesi ve Enzim-Substrat Etkileşimi

En basit alanda bir enzimin katalize ettiği tepkime;



şeklinde görülebilir. Burada “S” tepkimeye giren maddeyi, “E” enzim, “P” ise oluşan ürünü göstermektedir. Biyokimyasal tanımlamalarda tepkimeye giren maddeye substrat (S) denir. Enzim etkinliği “turnover sayısı” ile belirlenir. 1 mol etkin enzim tarafından 1



dakikada (yada 1 saniyede) ürüne dönüştürülen substratın mol sayısı olarak tanımlanmıştır.

Genellikle enzimler belirli tepkimeleri katalize etmektedirler. Bu duruma enzimlerin spesifikliğı denir.

Enzimlerin katalitik özellikleri enzim molekülünün tümünden ileri gelmez. Bu özellik molekülde bulunan bazı küçük bölgelerde gözlenmiştir. Bu kısımlara “aktif merkezler” veya “etkin bölge” denilmektedir.

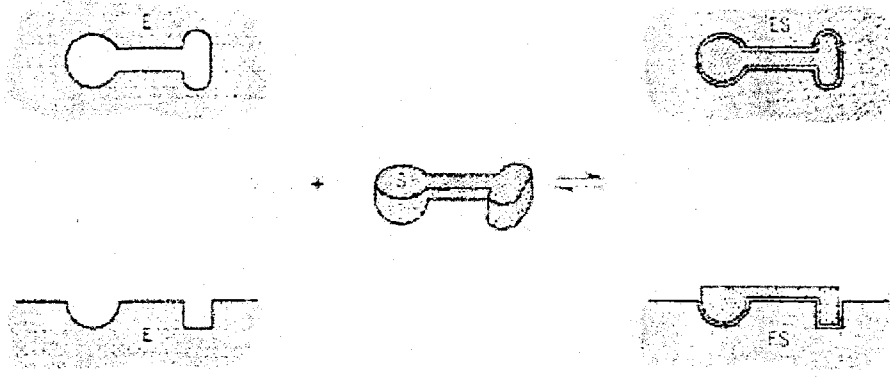
Enzimlerin dönüştürdükleri substrata karşı gösterdikleri yüksek spesifiklik, tepkime hızının substrat konsantrasyonu ile değişim karakteri ve tepkiyen moleküllerin enzim deaktivasyonunu önleme özelliğinin belirlenmesi, enzimli tepkimelerde ilk basamağın bir Enzim-Substrat (ES) ara bileşiğinin oluşumu olduğunu ortaya koymuştur. Bu ara bileşik, substrat molekülünün enzim üzerinde “etkin bölge” olarak adlandırılan bir bölgeye tutunması sonucu oluştuğı bilinmektedir (Dixon ve Webb, 1967; Segel, 1975). Etkin bölgenin substrat molekülleri üzerinde bulunan bazı gruplarla etkileşim özelliğine sahip aminoasit yan gruplarının çok özgül ve üç boyutlu bir yapı oluşturabilecek şekilde diziliş sonucu oluştuğı kabul edilmektedir.

Enzimlerin dönüştürdükleri tepkiyen için gösterdikleri seçicilik, enzim-substrat etkileşimi için ileri sürülen modellerin çıkış noktası olmuştur. Tek evreli tepkime sistemleri için geliştirilen bu modellerden en temel olanları Ficher tarafından ileri sürülen “anahtar ve kilit” ve Koshland tarafından ileri sürülen “uyarılmış biçimleme modelleri”dir (Segel, 1975).

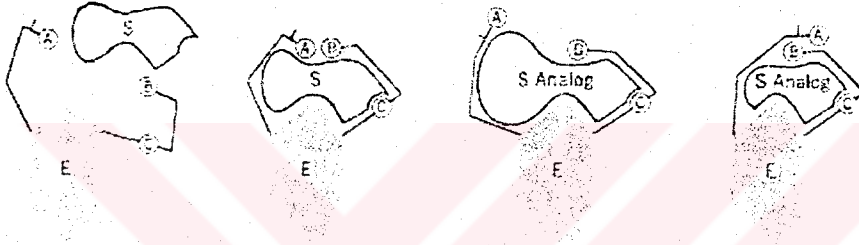
Anahtar ve Kilit Modeli: Bu model substrat molekülünün, enzim üzerinde kendisine geometrik olarak benzer ve değişmez bir şekli olan etkin bölgeye bağlanarak tepkimeye girdiğini varsayar (Şekil 3.1) (Segel, 1975).

Uyarılmış Biçimleme Modeli: Anahtar ve kilit modelinin birçok enzim tepkime mekanizmasını açıklayabilmesine karşın, modelin açıklayamadığı etkileşim türlerinin bulunması sonucunda, uyarılmış biçimleme modeli ileri sürülmüştür (Şekil 3.2) (Segel, 1975). Substrat molekülüne kimyasal yapı olarak benzeyen ancak değişik yan gruplar





Şekil 3-1. Anahtar ve kilit modeli (E: Enzim, S: Substrat, ES: Enzim-Substrat arabileşigi) (Segel, 1975)



Şekil 3-2. Uyarılmış biçimleme modeli (a) ve (b): Katalizleyici grupların (A, B) uygun şekilde yönlenmesini sağlayan substrat bağlanması. (c) ve (d): C grubu yardımıyla substrat benzeri yarışmalı gerileticilerin enzime bağlanması (Segel, 1975).

içeren moleküllerin enzime sıkıca bağlanmasına karşın tepkimeye girmemesi, iki substratlı enzim tepkimelerinde gözlenen substratların sıralı etkileşim özelliği, allosterik enzim davranışı, “cooperative” substrat bağlanması gibi gözlemler, substrat moleküllerinin sonucunda enzimde konformasyonel bir değişime sebep olması ve bu değişim sonucunda enzim üzerindeki gruplarla etkileşebilecek şekilde yönlendirilip biçimlenmesi şeklinde özetlenebilecek uyarılmış biçimleme modeli ile açıklanabilmektedir. Bu modele göre, bir molekülün tepkimeye girebilmesi için hem etkin bölgeye tutunması hem de etkin bölgedeki grupların uygun şekilde yönlenmesini sağlayacak değişimi gerçekleştirmesi gerekmektedir.



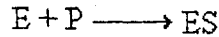
3.4. Enzimli Tepkimelerin Kinetiği

Enzim için ileri sürülen kinetik modellerin tümünde, substrat moleküllerinin enzim üzerinde etkin bir bölgeye/bölgelere tutunarak bir Enzim-Substrat ara bileşiği oluşturulmalıdır.

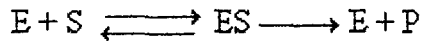
3.4.1. Tek Etkin Bölge Enzimler İçin Türetilen Henry-Michaelis-Menten ve Briggs-Haldene Eşitliği

Enzimli tepkimeler için ilk eşitlik 1903 yılında Henry (Segel, 1975) tarafından türetilmiştir. Bu eşitlik türetilirken, aşağıdaki varsayımlar yapılmıştır:

- 1) Enzim katalizleyicidir.
- 2) Enzim ve substrat, enzim-substrat ara bileşiği oluşturur.
- 3) Enzim ve substrat, önce enzim-substrat, sonra arabileşik-ürün ve enzime dönüşür.
- 4) Enzim ve substrat ile enzim-substrat ara bileşiği dengededir. ES ara bileşiği aynı anda E+S'ye bozunmakta ve E+P'ye dönüşmektedir.
- 5) Substrat konsantrasyonu enzim konsantrasyonundan çok fazladır ve ES ara bileşiğinin oluşması substrat konsantrasyonunu etkilemez.
- 6) Hız kısıtlayan basamak ES ara bileşiğinin ürün ve enzime dönüşme basamağıdır.
- 7) Substrat hızı, başlangıç tepkime hızı olarak alındığında;



basamağına doğru olan tepkime ihmal edilir. Bu varsayımlar sonucunda, tepkime mekanizması ve türetilen hız eşitliği aşağıdadır.



$$V = \frac{KS}{1 + \frac{S}{K_s}} \quad (3.1)$$

Henry'den 10 yıl sonra Michaelis ve Menten tarafından bu eşitlik;

$$V = \frac{V_{\max} S}{K_s + S} \quad (3.2)$$

şeklinde değiştirilmiştir. Bu eşitlik Michaelis-Menten eşitliği olarak bilinir.

S : Substrat konsantrasyonu,

V : Başlangıç tepkime hızı,

K : Sabit ($k_p E_o / K_s$),

K_s : Enzim-Substrat ara bileşiğinin bozunma hızı sabiti (k_{-1} / k_1),

$V_{\max}$: Maksimum başlangıç tepkime hızı ($k_p E_o$),

E_o : Toplam enzim konsantrasyonu.

Briggs ve Haldene, 1925 yılında enzim, substrat, enzim-substrat ara bileşiği arasında hızlı bir dengenin olması gerekmediğini ancak tepkimenin başlamasından çok kısa bir süre sonra ES ara bileşiği konsantrasyonunun yaklaşık olarak sabit bir değere ulaştığını ileri sürmüşlerdir. Ayrıca, tepkime hızının ES ara bileşiğinin yatışkın durum derişimi ile doğru orantılı olduğu varsayılmıştır. Bu varsayımlar sonucunda, kendi adları ile bilinen,

$$V = \frac{k_p E_o S}{K_m + S} \quad (3.3)$$

eşitliğini türetmişlerdir.

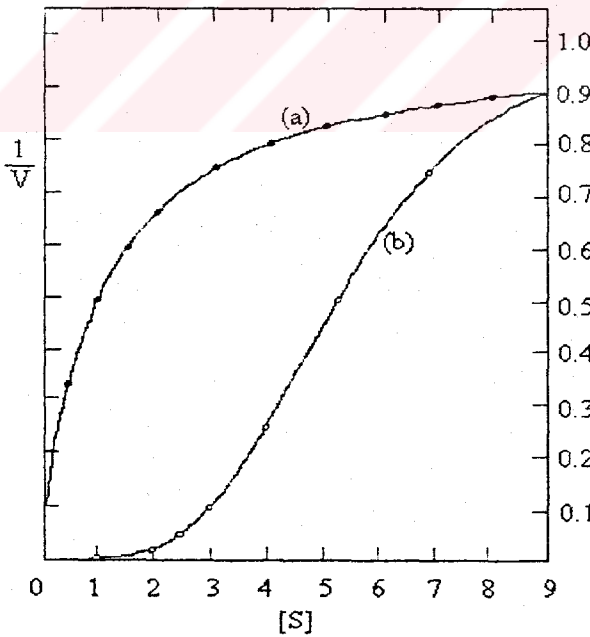
$$K_m = \frac{k_{-1} + k_p}{k_1} \quad (3.4)$$

3.4.2. Başlangıç Tepkime Hızının Substrat Konsantrasyonu İle Değişim Modelleri

Başlangıç tepkime hızı, substrat konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirildiğinde incelenen sistemin özelliklerine bağlı olarak, iki temel değişim modeli görülebilir. Bunlar hiperbolik ve sigmoid değişim modelleridir (Şekil 3.3).

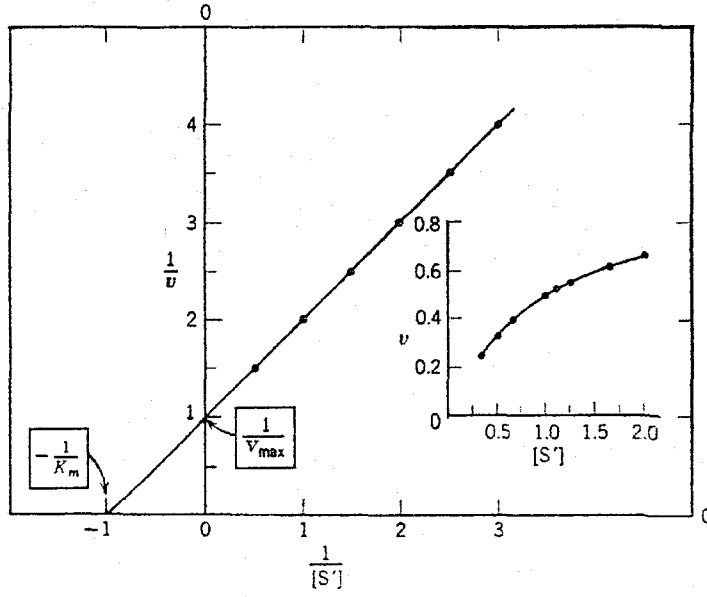
a) Hiperbolik Değişim Eğrileri ve Doğrusal Lineweaver-Burk Grafikleri: Tek substratlı ve etkin bölgeli enzimler için türetilen Henry-Michaelis-Menten ve Briggs-Haldene tepkime hızı eşitlikleriyle de tanımlandığı gibi, başlangıç substrat konsantrasyonuna karşı başlangıç tepkime hızı eğrileri hiperbolik karakterdedir. $1/\text{Substrat konsantrasyonuna } (1/S)$ karşı, $1/\text{Başlangıç tepkime hızı } (1/V)$ grafiğe geçirildiğinde bir doğru elde edilir (Şekil 3.4). Henry-Michaelis-Menten eşitliği Lineweaver-Burk formu eşitlik (3.5)'de verilmiştir.

$$(1/V) = (K_m/V_{\max}) (1/S) + (1/V_{\max}) \quad (3.5)$$



Şekil 3.3. Substrat konsantrasyonu ile başlangıç tepkime hızının iki farklı özellikteki enzim için değişimi

a) Hiperbolik değişim b) Sigmoid değişim (Segel, 1975).



Şekil 3.4. Başlangıç substrat konsantrasyonuna ($1/S$) karşı tepkime hızının ($1/V$), Lineweaver-Burk formunda grafiğe geçirilmesi sonucu K_m ve V_{max} 'ın bulunması (Segel, 1975).

b) Sigmoid Değişim ve Doğrusal Olmayan Lineweaver-Burk Grafikleri: Sigmoid değişim özelliği tepkime sistemlerinden en önemlileri şunlardır:

- 1) Birbirleriyle etkileşime girebilen birden fazla etkin bölgeye sahip enzimli tepkime sistemleri.
- 2) Substrat moleküllerine ilgiler açısından değişik özelliklere sahip ancak bağımsız olan, birden fazla etkin bölgeye sahip enzimli tepkime sistemleri.
- 3) Üçlü veya daha çok bileşenli bir kompleksin oluşmasında alternatif kinetik yolların bulunduğu, çok substratlı veya geriletici veya etkinleştirici içeren enzim tepkimeleri.
- 4) Substratlarla kompleks oluşturabilen ve dolayısıyla serbest substrat konsantrasyonunun azalmasına neden olan etkinleştirici ve geriletici içeren tepkime sistemleri.
- 5) Aynı tepkimeyi katalizleme özelliğine sahip, birden fazla enzim içeren tepkime sistemleri.

Belirlenen bu türlerden en önemli olanı "allosterik" enzim davranışının sonucu olan sigmoid değişim eğrileridir. Allosterik enzimler için Lineweaver-Burk grafiği doğrusal değildir.

3.4.3. Gerileticiler (İnhibitör) ve Enzim Deaktivasyonu

Enzimle katalizlenen tepkimelerde, tepkime hızının azalmasına neden olan herhangi bir madde “inhibitör” olarak adlandırılır (Schonheyder ve Volovartz, 1948). Enzim gerileticilerinin ve gerileticiler kinetiğinin incelenmesi, enzimin spesifikliği, etkin bölgenin yapısı ve tepkimenin kinetik mekanizması hakkında önemli sonuçlar verir. İnhibitörlerin iki farklı türü vardır. Birincisi, enzim kinetiği açısından pek önemli olmayan tersinmez inhibitörlerdir. Bu tip inhibitörler enzimle birleşerek enzim etkinliğini tamamen yok ederler. İkincisi, tersinir inhibitörlerdir. Bu inhibitörler farklı katalitik özelliklerdeki enzimlerle kompleks oluştururlar. Sonuçta, inhıbe olmuş enzimin ya K_m değeri yada V_m değeri azalır. Bazen V_m ve K_m 'nin sabit oranda azaldıkları veya tüm bu etkinliklerin birleşimi görülür. Basit tersinir inhibisyon türleri şunlardır:

- 1) Yarışmalı inhibisyon (Competitive inhibition),
- 2) Yarışmasız inhibisyon (Non-competitive inhibition),
- 3) Sınırlı yarışmalı inhibisyon (Uncompetitive inhibition),
- 4) Karışık tip inhibisyon (Mixed type inhibition).

Enzim deaktivasyonu, çeşitli nedenlerle enzim etkinliğinin zamanla azalmasını belirtir. Enzimlerde gerileticiler dışında, etkinlik kaybına yol açan başlıca nedenler şunlardır (Bailey ve Ollis, 1977):

- 1) pH,
- 2) Sıcaklık,
- 3) Akışkan kuvvetler (Kayma gerilimi, hidrostatik basınç),
- 4) Kimyasal maddeler (Alkoller, üre vb.),
- 5) Işınlama (Işık, ses, iyonlaştırıcı, radyasyon vb.).

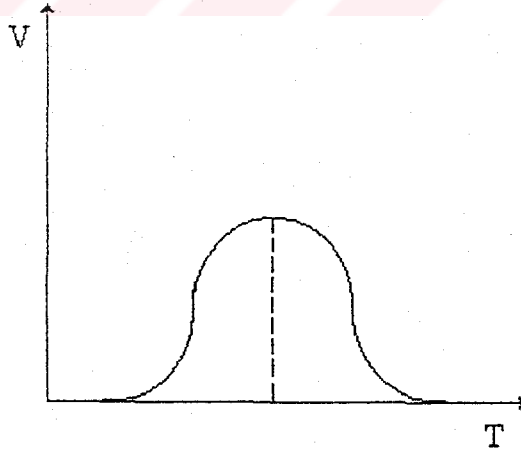
Bu etkiler ya enzimin doğal yapısını bozarak ya da etkin bölgesi/bölgelerinin iyonlaşma durumunu değiştirerek etkinliğin azalmasına neden olurlar.

3.5. Enzim Aktivitesini Etkileyen Parametreler

3.5.1. Sıcaklığın Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini incelemek oldukça karmaşık bir iştir. Çünkü, kimyasal kinetik kurallarına göre reaksiyon hızlarının sıcaklıkla arttığını bilmekteyiz. Enzim reaksiyonları ise ancak belirli bir sıcaklığa kadar bu kurala uyar. Başka bir deyimle, aktiviteleri belirli bir optimum sıcaklığa kadar giderek artar. Buna bağlı olarak enzimlerin katalize ettiği tepkime hızları da optimum sıcaklığa kadar, sıcaklıkla orantılı olarak artmaktadır.

Belirli bir sıcaklıktan sonra enzimler yapısal değişmeye ve denatüre olmaya başlar. Bunun sonucu olarak da enzim aktivitesi azalır. Bu nedenle optimum sıcaklıktan daha yüksek sıcaklıklarda enzim tepkimeleri yavaşlamaya başlar. Gerçekte bir süre sonra enzim tamamen denatüre olacağından tüm aktivitesini yitirerek etkisiz hale geçer ve tepkime durur. Genellikle enzimlerin çoğu 50-60°C'de etkisiz (inaktif) hale geçmektedir. Bununla beraber 80-100°C sıcaklığa kadar aktivitelerini koruyan enzimlere de rastlanmaktadır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Enzim tepkimesinin hızı ile sıcaklık arasındaki değişim

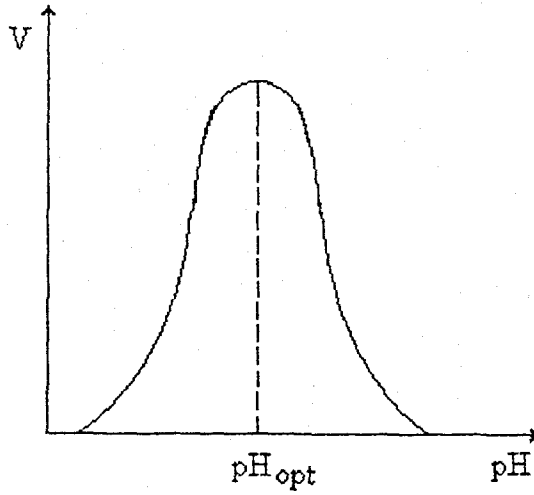
3.5.2. pH'nın Etkisi

Enzimlerin en yüksek etkinlik gösterdiği belirli pH'lar vardır. Bu değerden yüksek yada düşük pH'larda enzimlerin etken grupları değişime uğrayarak yada kendileri belirli ölçülerde denatüre olarak etkisiz (inaktif) hale geçerler (Şekil 3.6).

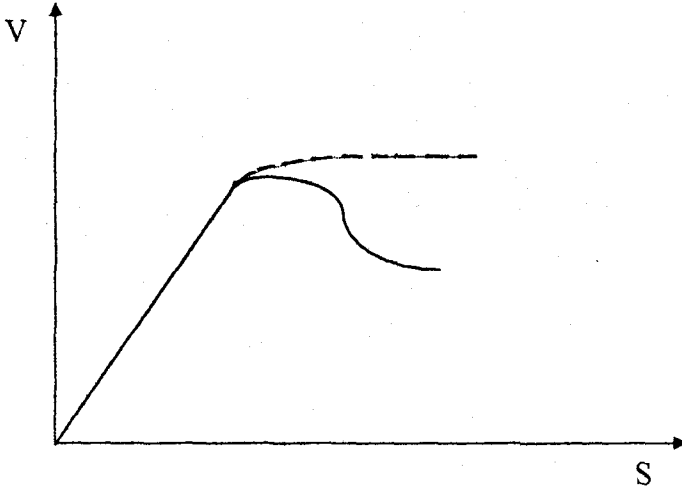
Belirli bir optimum pH'nın altında ve üstünde enzim aktivitelerindeki düşme, enzimatik tepkimeye ilişkin K_m ve k_2 sabitlerinin pH ile birlikte değişik değerler almasından ileri gelir. Çünkü, çözeltinin pH'sının değişmesi, enzimlerin etken noktalarında bulunan gruplara etki ederek bunları belirli pH bölgelerinde iyonlaştırır. Aktif gruptaki bu değişimler ise enzimatik tepkimenin K_m ve k_2 sabitlerini, yani hızlarını etkiler.

3.5.3. Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

Enzimli tepkimelerde substrat konsantrasyonu arttıkça enzim aktivitesi de artar. Fakat birçok durumda substrat konsantrasyonunun aşırısında enzim aktivitesinin düştüğü gözlenir. Buradan, substratın fazlasının enzimi inhibe ettiği anlaşılmaktadır (Şekil 3.7).



Şekil 3.6. Enzimatik bir tepkimenin hızı ile pH arasındaki bağıntı ve optimum pH

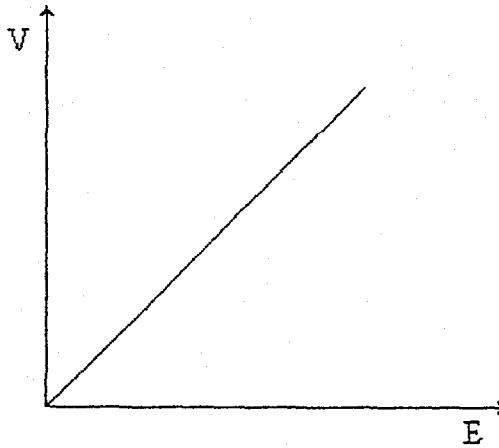


Şekil 3.7. Substrat konsantrasyonu ile tepkime hızı arasındaki değişim

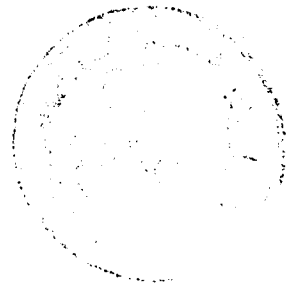
Eğer, substratın inhibisyon etkisi yoksa, substrat konsantrasyonu ile enzim aktivitesi arasında Şekil 3.7’de kesikli çizgilerle belirtildiği gibi bir değişim gözlenir.

3.5.4. Enzim Konsantrasyonunun Etkisi

Enzim tarafından katalize olunan bir reaksiyonun başlangıç hızı (V) enzim konsantrasyonu (E) ile doğru orantılıdır. Bunun nedeni de her enzim molekülünün diğerlerinden bağımsız olarak çalışmasıdır. Bu nedenle de ne kadar çok enzim molekülü varsa ve çalışıyorsa, reaksiyon da o kadar hızlı olacaktır (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Enzim aktivitesi üzerine enzim konsantrasyonunun etkisi



3.6. Enzim Üretimi

Ticari öneme sahip enzimlerin çoğu mikroorganizmalardan elde edilir. Ancak özellikle gıda sanayiinde kullanılan bazı enzimlerin bir kısmının zararlı olabilme ihtimali, bu konuda yeni, zararsız, toksik etkisi olmayan mikrobiyal enzim üretimi ile ilgili çalışmaların artmasını sağladı.

Hayvansal kaynaklı sadece birkaç enzim vardır (pankreas lipazı, tripsin vb.). Ancak mikroorganizmalardan elde edilen benzer enzimler bu tür enzimlerin yerini kolaylıkla alabilir. Bununla birlikte, mikrobiyal yolla üretilen enzimler katalitik olarak daha etkin olmasına rağmen, prosese zararlı olabilecek birtakım farklı özellik gösterebilir. Bunu gidermek için de son yıllarda rekombinant DNA tekniği ile planlanmış genetik malzemelerle enzim üretimi çalışmaları üzerinde durulmaktadır.

Bitkiler de birçok enzim üretimine kaynak teşkil etmiştir. Örneğin, sistein proteinaz enzimi, papaya, incir, ananas ve diğer bazı bitkilerin öz suyundan bol miktarda izole edilmektedir. Bu bitkilerin en büyük avantajı içerdikleri öz suların kolaylıkla alınabilmesidir. Bir diğer bitki kökenli enzim kaynağı de içki endüstrisinde sıkça kullanılan malttır. Malttan çeşitli proteinaz glikohidrolaz türü enzimler kolaylıkla izole edilmektedir.

Hayvanlardan ve bitkilerden enzim üretimi çok çeşitli sebeplerden dolayı sınırlı olup, üretilen toplam enzim miktarındaki oran gittikçe azalmaktadır. Örneğin proteolitik enzimleri üreten bitkiler en iyi 3. Dünya ülkelerinde, yani tropikal ülkelerde üretilir. Dolayısıyla böyle bir kaynaktan enzim üretimi kaynak temini gibi problemle sınırlanmış olur.

Hayvansal kaynaklı enzim üretimi de birtakım ekonomik problemleri içerir. Bunlar genellikle sakatatlardan üretildiği için üretim tamamen et endüstrisine bağlıdır. Yani hayvan orijinli enzim üretimi için sabit fiyatlı bir hammadde kaynağı mümkün değildir.

Bitkisel ve hayvansal kaynaklı enzim üretimi yukarıda da bahsedildiği gibi teknik olarak mümkünse de ekonomik olarak bazı kısıtlamalara sahiptir. Diğer bir husus da bitki ve hayvan hücrelerinin büyüme hızları oldukça düşüktür. Bu durum kültür

ortamının kontaminasyon şansını arttırmaktadır. Yapılan araştırmalara göre bitki ve hayvan hücrelerinden elde edilen enzim üretimini ekonomik olarak devam ettirebilmek için mikrobiyal fermantasyon ile elde edilen enzime diğerlerinden bin kat daha değer biçmek gerekir. Tüm bunların sonucu olarak endüstriyel amaçlı enzim üretimi mikroorganizmaların kullanılmalarıyla yapılmaktadır (Gacesa ve Hubble, 1992).

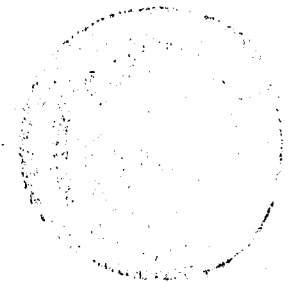
3.6.1. Mikrobiyal Enzim Üretimi

Mikroorganizmalar çok büyük ölçüde, enzim üretme potansiyeline sahiptirler ve ayrıca bunların çoğu hücreden ortama salgılanır. Diğer taraftan, mikroorganizmalar kültür ortamında hem kolay hem de hızlı bir şekilde büyür ve bu durum endüstriyel alana kolaylıkla uygulanabilir.

Ekstrasellular, yani ortama salgılanan enzimlerin üç avantajı vardır.

- a) Enzim dışarıya salgılandığı için, büyük ölçekli üretimde oldukça zor olan hücre parçalama tekniklerinin kullanılmasına gerek kalmaz.
- b) Sadece belirli sayıda protein salgılar, dolayısıyla istenen enzim karışımından izole edilmesi nispeten kolay olur. İntrasellular yani hücre içi enzimlerde ise, enzimin diğer bütün proteinlerden ayrılması gerekir.
- c) Ekstrasellular enzimler, intrasellular enzimlerden daha sağlam yapıya sahip olup, sıcaklığa karşı yani denatürasyona karşı daha az hassastırlar.

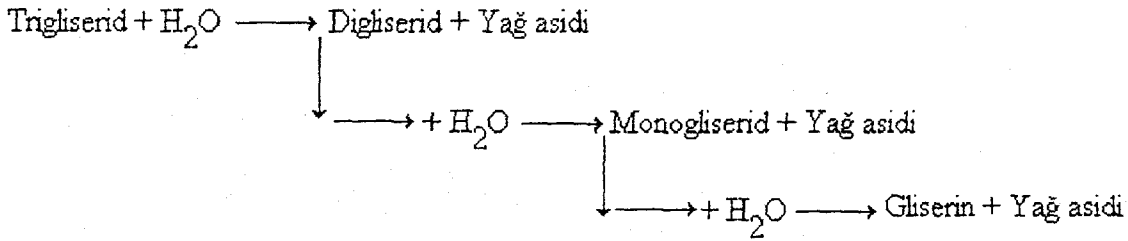
Bu problemlerden dolayı mikroorganizmalar, özellikle enzimi dışarıya salgılayanlar, endüstriyel üretimin ham maddesini oluştururlar.



4. LİPAZLAR

4.1. Genel

Lipazlar, gliserin ile yağ asitlerinden oluşan esterleri hidroliz eden enzimler olarak tanımlanır. Hidroliz tepkimesi sonucu digliserid, monogliserid, gliserin ve yağ asidi oluşur. Lipazın katalizleyici etkisiyle trigliserid hidrolizi tepkimesi aşağıdaki şekilde gösterilebilir (Brocher ve Holf, 1979).



Ester hidrolizi gerçekleştiren diğer bir enzim grubu da esterazdır. Esterazlar çözünmeyen konsantrasyonlarında etkin değildirler (Verger ve Haas, 1976). Lipazlar, Uluslar arası Biyokimya Birliği Enzim Komitesince verilen "Glycerol-Ester Hydrolase (3.1.1.3)" sistematik adıyla tanımlanır (Meita, 1979).

3. Hidrolaz

3.1. Ester bağımlı etkileyenler

3.1.1. Karboksilik hidrolazlar

3.1.1.3. Gliserol-ester hidrolazlar

4.2. Lipaz Kaynakları

Lipazlar bitkisel kaynaklardan, hayvansal dokulardan ve mikroorganizmalardan elde edilir. Hayvansal lipazlar, doku ve vücut sıvılarının çoğunda; bitkisel lipazlar, bitkilerde katman doku, kabuk ve köklerde bulunurlar. Lipazlar, pek çok mikroorganizma türlerinin bünyelerinde doğal olarak bulunur. Lipazlar elde edildikleri kaynaklar göz önüne alınarak şu şekilde sınıflandırılabilirler:



1) Hayvansal lipazlar

- a) Sindirim sistemi lipazları (Pankreas lipazı vb)
- b) Doku lipazları (Karaciğer lipazı vb)
- c) Süt lipazları

2) Bitkisel lipazlar (Gene otu lipazı, çörek otu lipazı vb)

3) Mikroorganizma lipazları (*Rhizopus arrhizus*, *Aspergillus niger* vb)

4.3. Lipazın Kullanım Alanları

Bugünkü durumuyla lipazın kullanım alanları şöyledir:

1) Gıda endüstrisi: Çikolata, bisküvi, dondurma, krema, peynir ve margarinlerin kalitesinin artırılmasında. Ekmeğe bayatlamaz özellik kazandırmada . Yumurta akının akışkan özelliğini değiştirmede ve mayonez üretiminde.

2) Dericilikte: Derilerin tabaklanması

3) Yağ asidi ve gliserin üretiminde

4) Tıpta: Sindirim sistemi bozukluklarında kullanılan ilaçların yapımında ve biyokimyasal analizlerde.

5) Atık suların arıtımında ve kirli boruların temizlenmesinde.

6) Kozmetik sanayinde

4.4. Lipazların Katalizleyici Özellikleri

Lipazların, üzerinde etkin olduğu doğal substratlar uzun zincirli yağ asitlerinin esterleridir (Uçar vd., 1987). Esteraz türü enzimler ise düşük molekül ağırlıklı yağ asitlerinin esterleri üzerinde etkilidirler. Lipazların sulu ortamda çözünen molekülleri olarak dağılmış substratlara karşı etkin olmamasının bu iki grup arasındaki en temel farkı oluşturduğu ileri sürülmüştür (Desnuelle, 1972). Lipazın, en önemli özelliği olan hidroliz tepkimesini hidroforik ara yüzeylerde gerçekleştirmesi ilk olarak, Willstaetter ve arkadaşları tarafından belirlenmiştir (Wills,1965). Daha sonra, tricaproinin pankreas

lipazı ile hidrolizini inceleyen Schonheydek ve Wolqwartz, bu trigliseridin suda çözünen konsantrasyonunda düşük bir hızla hidroliz olmasına karşın çözünürlük aşıldığında hidroliz hızının ani olarak yükseldiğini gözlemişlerdir (Sarda ve Desnuelle, 1958). Daha sap enzim preparatlarının elde edilebilmesi, bu problemin yeniden incelenmesine olanak sağlamış ve Sarda-Desnuelle pankreas lipazı ve esteraz ara yüzey tarafından etkinleştirilip etkinleştirilmedikleri ölçütüne göre ayırt edilebilecekleri görüşünü ileri sürmüşlerdir. Sulu ortamda sınırlı çözünürlüğe sahip olan triasetinin pankreas lipazı ve esteraz ile hidrolizini inceleyen bu araştırmacılar esteraz ile hidrolizde başlangıç tepkime hızının triasetin konsantrasyonu ile klasik Michaelis-Menten kinetiğine uygun şekilde değiştiğini saptamışlardır. Aynı tepkimenin lipazla hidrolizinde ise çözünür bölgede hidroliz hızının çok düşük olduğu, çözünürlük sınırı aşıldığında hidroliz hızının aniden yükseldiği belirlenmiştir (Desnuelle, 1972).

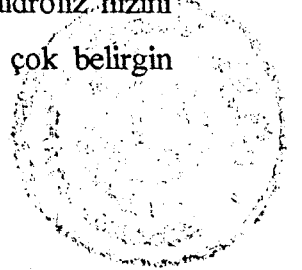
Daha sonra Entressangles ve Desnuelle, pankreas lipazın suda çözünen basit trigliseridleri de yüksek hızda hidroliz ettiğini ve çözünürlük sınırı ötesinde hidroliz hızında ani bir artış gözlenmediğini belirtmişler ve bu davranışı ortamda NaCl etkisiyle, çözünür bölgede küçük molekül kümeleri oluşumuna (misel oluşumu) bağlamışlardır.

Uzun zincirli trigliseridler sulu ortamda emülsiyon halinde heterojen evre oluşturur. Böyle heterojen bir sistemde ve deney koşullarında, hidroliz hızını denetleyen en önemli faktörün, etkin arayüzey alanı olduğu belirtilmektedir (Desnuelle, 1972). Substrat moleküllerinin arayüzeydeki konsantrasyonu ve dizilişi hidroliz hızını etkileyen önemli faktörlerdir.

Trigliseridlerin lipazla hidrolizinde, yağ asidinin zincir uzunluğunun hidroliz hızı üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. Genel olarak, kısa zincirli yağ asidi esterlerinin daha hızlı şekilde hidroliz edildiği söylenebilir.

4.5. Aktivatörler

a) Safra Tuzları: Safra tuzları (bile salt) emülsifiye edici madde olarak substrat olan trigliseridin ve pankreatik lipaz çözeltisinin yüzey alanını artırarak hidroliz hızını dolayısıyla enzimin gözlenir aktivitesini arttırmırlar. Ayrıca safra tuzlarının çok belirgin



bir özelliği de yağ asitleri+sabunlarla çözünür “mixed micelles “ oluşturmaları ve bu bileşiklerin hidrofobik ara yüzeyden suya difüzyonlarının hızlandırılmasıdır (Benzonana, 1969). Çünkü uzun zincirli trigliseridlerle yapılan çalışmalarda oluşup emülsifiye edilmiş taneciklerin ara yüzeyinde biriken yağ asitleri ve sabunların tepkime hızını azalttığı gözlenmiştir (Benzonana, 1968). Düşük konsantrasyonlarda ilave edilen safra tuzu başlangıç tepkime hızına %10’u geçmeyen bir arttırmada bulunur. Pankreatik enzimin tersine “*Rhizopus arrhizus*” kaynaklı lipazda kritik “misel” konsantrasyonuna kadar ortama katılan safra tuzlarının aktifleyici etkisi gözlenememiştir (Samerra ve Dufou, 1972).

Safra tuzlarının bilinen diğer bir özelliği de lipazın optimum pH’sını 8-9’dan 6’ya kaydırmasıdır.

b) Sodyum Klorür: İlave edilen seyreltik NaCl uzun zincirli yağ asitlerinin iyonizasyonunu artırır. NaCl’nin çok düşük konsantrasyonlarının etkilenmesiyle hidroliz hızı artar (Benzonana, 1968).

c) Kalsiyum (+2) İyonları: Kalsiyum iyonlarının lipaz tarafında katalizlenen hidroliz reaksiyonlarını doğrudan doğruya katalizlediği gözlenmiştir. Aynı zamanda sentez reaksiyonunu da katalizler (Nevgi ve Ramakrishnan, 1958). 1945’de Schonheydek ve Wolqwartz, kalsiyum iyonlarının temel görevlerinin tepkimenin olduğu ara yüzeyde biriken yağ asitlerini çözünmez kalsiyum sabunları olarak uzaklaştırması olduğunu bildirdiler. Günümüzde bu açıklama genel olarak kabul edilmekle beraber, aynı mekanizma düşük molekül ağırlıklı yağ asitlerini oluşturan hidroliz tepkimelerini açıklamaz. Bu büyük bir olasılıkla Ca^{+2} iyonlarının doğrudan doğruya enzim yapısı üzerinde etkisinden kaynaklanmaktadır (Bier ve Mord, 1951).

d) Diğer Proteinler: Lipazın yumurta albümini veya jelatin gibi proteinlerle veya serum gibi maddelerle etkinliğinin artımı büyük bir olasılıkla substratın daha iyi emülsifiye olmasından ileri gelmektedir. Aminoasit ve polipeptidlerin, özellikle gliserin içerenlerin çok etkin aktivatör oldukları bildirilmiştir (Abderhaclden ve Geidel, 1932).



4.6. Tepkimeyi İzleme Yöntemleri

Lipaz enziminin katalizlediği tepkimelerde trigliserid ortamdan kaybolur ve ara tepkimelerde monogliserid ve digliseridlerin oluştuğu tepkimenin son ürünleri yağ asitleri ve gliserollerdir. Dolayısıyla ürünün oluşumu veya substratın azalması gözlenerek tepkime izlenebilir.

4.6.1. Trigliserid Azalma Hızının Saptanması

a) Stalagmometrik Metod: Bu yöntem öncelikle tributirin substratı için geliştirilmiştir. Substrat hidroliz oldukça, substrat emülsiyonun yüzey gerilimi suyun yüzey gerilimine yaklaşır. Tepkime karışımının stalagmometreden damlama hızı, lipazın olmadığı karışımın damlama hızıyla karşılaştırarak (Lacgertöf, 1947) veya damlalar tartılarak (Lacgertöf, 1947 ve Scand, 1962) yüzey gerilimindeki değişim ölçümlenebilir (Ruggieri ve Bellias, 1955).

b) Türbidimetrik Metod: Bu yöntemde ise tepkimenin oluştuğu ortamdaki emülsiyonun berraklığının zamanla değişimi ölçülür. Tributirin veya daha kısa zincirli trigliseridler substrat olarak kullanıldığında, ürünler örneğin monobutirin veya gliserin ve butirik asit suda tamamen çözünürler ve böylece artan berraklığın tek nedeni trigliserid kaybı olur. Bu süreç keza yüksek zincirli trigliseridler de uygulanabilir. Bu tip izleme yöntemi özellikle lipoprotein lipazları için önerilir.

4.6.2. Yağ Asidi Artım Hızının Ölçülmesi

a) pH-Stat Yöntemi: Hemen hemen en çok tercih edilen yöntem budur. Özellikle asit gibi ortamın çalışma pH'sını değiştirecek ürünleri oluşturan tepkimelerde katalizör olan enzimin etkinliği, pH ile fazla oranda değişeceğinden bu gibi tepkimeleri klasik denetleme pH-stat metodudur. Burada genellikle bir cam veya diğer bir elektrod tepkime ortamına daldırılarak ortam pH'sı ölçülür ve ürünün niteliğine göre artan H^+ derişimi otomatik titratörle azaltılır ve sabit pH değeri sağlanır. Tepkime süresince aktarılan baz (genellikle NaOH) mikrobüretten ölçülür (Marchis ve Mauran, 1959).

Lipaz enziminin söz konusu olduğu durumda oluşan sabunun enzimin etkinliğini de değiştirici niteliği olduğundan saptanabilecek en doğru değer ilk başlangıç hızlarıdır.

b) Warburg Analizi: Burada da oluşan yağ asidinin ortamdaki bikorbonat tamponu ile hızlı tepkimeye girerek, beliren CO_2 hacmi zamanla bir gazometreden ölçölür (Wills, 1961).

c) Dilatometrik Yöntem: Geniş spektrumlu bir izleme yöntemi olmadığı halde prensip olarak hidroliz veya sentezle oluşan ürünlerin özgül hacimlerinin zamanla toplam hacimdeki değişimine dayanır (Amman ve Bartseht, 1934).

d) Kolorimetrik Yöntemler: Hidroliz sonucu oluşan ürünlerden birisinin fotometrik olarak gözlenebilecek bir kompleks oluşturması temeline dayanmaktadır. Örneğin ortama p-nitrofenol ilavesi meydana gelen butirik asidi kolaylıkla izleyebilecek p-nitrofenilbutirata dönüştürür (Gad, 1949).

e) Radyoaktif Yöntem: Genellikle mikro ölçekte kullanılan yöntem radyoaktifleştirilmiş uzun zincirli trigliseridlerin kullanımına dayanır. Oluşan yağ asidi sürekli olarak ortamdan ayrımlanır ve sayılır (Bayer, 1930).

4.7. Aktivite ve Birimler

Günümüzde tüm ezimler için uluslar arası standart enzim birimi kullanılmaktadır. International Union of Biochemistry (IUB)'nın saptayışına göre; bir birim (U) enzim, standart koşullar altında 1 dakikada 1 μ mol substratı dönüştürebilen miktar olarak tanımlanır. Yalnız bazı tür enzimler örneğin lipaz, elde edilif kaynağına göre çeşitli trigliseridlere farklı spesifiklik gösterir. Bu nedenle enzim aktivitesinden bahsederken standart koşulları, enzim kaynağını ve substratı tanımlamak lazımdır. Örneğin bir tür lipaz için, zeytinyağına göre 6700 U/gr demek o enzimin 1 gramının 1 dakikada standart koşullar altında 6,7 mmol zeytinyağını bileşenlerine ayıracağını söylemek demektir.



4.8. Substrat Seçimi

Teorik olarak bünyesinde tek ester bağı içeren esterler daha fazla ester bağı olanlara tercih edilirler. Çünkü poliester bağları tepkimeyi anlaşılabilir şekilde etkiler ve kinetik değişir. Buna karşın pek çok ester de lipaz için zayıf substratlardır. Bundan dolayı trigliseridler her olasılıkla tercih edilen substrat olmaktadır.

Kısa zincirli trigliseridler lipaz etkinliğini ölçümlemek için tavsiye edilebilir substratlardır. Tributirin emülsiyonları uzun yıllar tatmin edici sonuçlarla çalışılmıştır. Açığa çıkan butirik asit manometrik olarak (Wills, 1961) veya titrasyonla saptanabilir. Tributirinin, uzun zincirli trigliseridlere göre olan avantajları oldukça fazladır. Emülsifiye edici maddenin yokluğunda bile oldukça yumuşak koşullarda iyi emülsiye olur. Butirik asit ve sodyum butiratın suda iyi çözünmesinden ötürü yağ asidi tutucularına gerek kalmaz. Titrasyon butirik asidik düşük pK'sından ötürü kolaylıkla yapılır.

5. KATI HAL (SOLID-STATE) FERMANTASYONU (KHF)

Katı hal fermantasyonu (KHF), katı ya da yarı katı substrat kullanılarak gerçekleştirilen yeni bir fermantasyon türüdür. Fermantasyon, su içermeyen veya sınırlı oranda serbest su ihtiva eden katı substrat üzerinden yürütülür. Ortamın minimum nem içeriği % 12'nin altına düştüğünde mikrobiyal aktivite durur. Nem içeriği % 30-80 arasında tutulabilir. Bu nedenle katı fermantasyonunda kullanılan mikroorganizmalar genellikle çok düşük su aktivitesinde (a_w) bile büyüeyebilen mikroorganizmalardır. Mikroorganizmalar su aktivitesine karşı farklı davranırlar. Her mikroorganizmanın belli koşullar altında kendine özgü a_w değeri vardır. Örneğin, $a_w = 0.95$ den daha küçük değerlerde bakterilerin büyümesi inhibe edilir. Buna karşılık fungi (küf mantarları) ve mayalar yaklaşık $a_w = 0.7$ civarında yaşayabilirler. Katı hal fermantasyonunu doğal kültür mikroorganizmalarla yapılabildiği gibi (örneğin, şapkaklı mantar üretimi), izole edilmiş saf kültürlerle de yapılabilir.

Katı hal fermantasyonu biyokimya ve mikrobiyoloji prensipleri tam olarak anlaşılmadan yüzyıllarca ürün eldesi için kullanılmıştır. Katı hal fermantasyonuyla üretim "koji" prosesine dayanır. Japonların geleneksel koji prosesi, 25-30 °C' de havalandırılmalı bir ortamda tabakalarca istiflenmiş sepetlerde yüksek nemlilikle aşılınmış substratın fermantasyonuyla meydana gelmektedir. Substrat olarak genellikle pirinç, buğday veya soya fasulyesi gibi nemli maddeler kullanılırdı. Bu substratlar üzerinde *Aspergillus oryzae* gibi filamentli mantarların gelişmesiyle enzim karışımı üretilir ve besinlerin tadı değiştirilirdi. Bu tür endüstriyel proseslerin kontrolü çok güçtür. Bu proseslerde hedeflenen modifikasyonlar sıcaklık, pH ve nemlilik gibi çevresel koşulların kontrolünü kolaylaştırmak ve bu kontrolleri fermantasyon yığının tümünü etkileyecek şekilde geliştirmektir.

Sıklıkla çalışılan ortamlar, nemli buğday kepeği, mısır, pirinç v.b. bazı karbonhidrat kaynakları veya bunlarla birlikte bazı tuzları içeren ortamlardır. Ortamlar genelde çok basit ve ekonomiktirler, besin gereksinimlerinin çoğu hububatlardan sağlanır. Katı hal fermantasyon ortamının sterilizasyonu düşük pH' larda buharla, kimyasal yöntemlerle veya her ikisinin kombinasyonu ile yapılır. Sterilizasyon sonrası soğutulan nemli kütle üzerine seçilen mikroorganizma spor süspansiyonu aşılır. 25-40

°C arasında tutulan sıcaklıkla genellikle 1-10 gün süresince büyümesi sağlanır. Metabolik ısı ve kültürden yüksek su kaybından dolayı fermantasyon ortamının sıcaklığının ve nem içeriğinin kontrolü güçtür. Katı hal fermantasyonu, ortamın homojen olmamasından dolayı fermantasyonun gelişimini takip etmek zordur.

Endüstriyel katı hal fermantasyonunun pek çoğu aerobik ortamda gerçekleştirildiğinden fermantasyon şartları oksijen transferinin ve CO₂'yi ortamdan uzaklaştıracak şekilde ayarlanmalıdır. Ayrıca substrat olarak kullanılan partiküllerin büyüklüğü de katı hal fermantasyonunda oldukça önemlidir. Çünkü iyi bir gaz ve ısı transferi için partiküller arasındaki boşluğun optimize edilmesi gerekir. Isının uzaklaştırılması, sistemin hava akış hızının artırılmasıyla nispeten kolaylaştırılabilir.

Katı hal fermantasyonuyla enzim üretiminin avantajları aşağıdaki şekilde sıralanabilir:

- a) Genel olarak birkaç organik tuzun ilave edildiği buharla muamele edilmiş hububat gibi çok basit ortamlar kullanılmaktadır ayrıca kullanılan ekipmanlar düşük güç harcarlar,
- b) Düşük nemli ortamlarda çalışıldığı için çoğu kontaminant bakteri türlerinin üremesi inhibe olmaktadır ve etrafıca sterilizasyon proseslerine olan ihtiyaç azalmaktadır,
- c) Nem miktarı düşük olduğundan substratın birim ağırlığı başına olan hacmi düşük olacağından kepektaki enzim aktivitesi çok yüksek olabilir. Böylece verilen fermentör hacmindeki enzim verimi derin fermentör sistemlerinden çok daha büyük olabilmektedir. Ayrıca atıkların işleme gereksinimleri azalabilir.
- d) Aşılama basamakları gereksizdir, genelde sporla yapılan ekim yeterli olmaktadır,
- e) Küçük hacimli suyla fermantasyon kepeğinden nispeten konsantre enzim çözeltileri elde edilebilir.



Bu avantajların yanında bazı dezavantajları da vardır. Bunları da şöyle sıralayabiliriz:

- a) Düşük nem konsantrasyonunda gelişebilen mikroorganizmalar veya mantarlarla sınırlıdır,
- b) Proses parametrelerinin ölçümü kültürün homojen olmamasından dolayı güçtür,
- c) Sıcaklık, oksijen transferi, pH gibi fermantasyon parametrelerinin kontrolü güçtür,
- d) Substratların çoğu ön işlemler, özel tavalar şeklinde ekipmanlar ve çok fazla el emeği gerektirmektedir.

Bu dezavantajlara rağmen yinede bir çok enzim bu yöntemle başarıyla üretilmektedir. Pektinaz gibi tamamlayıcı enzimlerin kompleks bir karışımını içeren ürüne ihtiyaç duyulduğu zaman bu yöntem oldukça kullanışlıdır. Bu yöntemle üretilen enzimlere örnek olarak proteaz, amilaz, laktaz, pektinaz, amiloglikozidaz ve rennin verilebilir. Yeterli gelişme sonrası kültür ortamı suyla ekstrakte edilir, santrifüjlenir, iyon değiştirici kolanlardan geçirilir. Daha sonra vakum altında kurutulur.

Katı hal fermantasyonunun kullanıldığı çalışmalara örnek verecek olursak; Munoz vd. (1991), *Penicillium candidum*, *Mucor miehei* ve *Penicillium canembertii* gibi üç misel oluşturan mikroorganizmadan katı hal fermantasyonu ile lipaz üretimi incelenmiştir. Karbon ve azot kaynağı olarak kepeğin kullanıldığı bu çalışmada en fazla ve en kararlı üretimin *P.candidum*' un verdiği rapor edilmiştir.

Bir diğer çalışmada Zhu (1994), katı hal fermantasyon şartlarını elde etmek için poli ürethan foam parçacıkları ve buğday kepeğinin kimyasal içeriğine özdeş bir ortam kullanmışlardır. Böylelikle katı hal fermantasyonunda kolaylıkla ölçülemeyen biyokütlenin bu şekildeki fermantasyon ortamı ile mümkün olabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca yine bu çalışmada *Penicillium citrinum*'dan elde edilen amilaz ve nükleaz enzimlerinin aktivitelerinin yapay katı hal fermantasyon şartlarında daha iyi olduğu gözlenmiştir.



Tao vd. (1996) ise *Trichoderma viride*'den selüloz enziminin üretiminde kullandıkları yeni bir katı hal fermantörü dizayn etmişlerdir. Bu çalışmada hava basıncının periyodik olarak değiştirilmesiyle selüloz enziminin kontrol deneylerine göre 2-3 kat arttığı belirlenmiştir.

Katı hal fermantasyonunda daha etkili substrat degradasyonu için farklı mikroorganizmaların yer aldığı karışık kültürün kullanımı da mümkündür. Örneğin, şeker kamışı posasının substrat olarak kullanıldığı böyle bir çalışmayla selüloz, endoglukonaz ve β -glukosidaz aktivitelerinin arttığı belirlenmiştir (Gutierrez vd., 1997).

Reddy vd. (1999), *Clostridium thermosulfurogenes* SV2 mikroorganizmasıyla karbon, azot, tuz ve organik kompleks madde içeren 15 farklı besi kaynağından KHF ile β -amilaz ve pullunaz üretimini gerçekleştirmişlerdir. 15 besi kaynağı gözden geçirildiğinde elde edilme kolaylığı, fiyatı ve yüksek ürün verme özelliklerine göre en iyileri; magnezyum klorür, patates nişastası, demir sülfat, mısır özü suyu'dur.

Tunga vd. (1998), *R. oryzae* kullanarak KHF ile ekstrasellüler proteaz üretmişlerdir. En yüksek enzim aktivitesi 32 °C sıcaklık, % 90 bağıl nem, % 140 katı substratın nem içeriğinde tuz çözeltisi (M-9)'la pH 5.5'e ayarlandığında 341 U/g buğday kepeği olarak bulunmuştur.

Sekar ve Balaraman (1998), *Tolypocladium* mantarı kullanarak KHF'la maksimum Cylosporin A'nın üretimi için; a) katı substrat yatağının kalınlığı, b) inokulum boyutu, c) inokulum tipi, d) bağıl nemliliğin etkilerini incelemiştir. Sonuçta incelenen tüm parametreler üretimi etkiledi.

Besson vd. (1997), *Bacillus subtilis*'le soya fasulyesi kullanarak KHF ile 2,5-Dimetilpirazin (2,5 DMP) ve tetrametilpirazin (TTMP) üretmişlerdir. Bu çalışma hem dolgu kolon reaktörde hem de 100 ml'lik erlenlerde gerçekleştirilmiştir.

Souza vd. (1999), *Thermoascus aurantiacus* using'le yarı katı fermantasyonla xylazın üretmişlerdir. Xylazın üretiminde çoklu değişken istatistik yaklaşımı, ortamın başlangıç nemi, kültürasyon zamanı, inokulum seviyesi, şeker posası ağırlığı gibi



değişkenlerin etkileri incelenmiştir. Xylazın aktivitesini etkileyen en önemli parametreler başlangıç nem içeriği ve şeker kamışı posası ağırlığıdır.

Tunga vd. (1999), KHF ile *R.oryzae*'den büyük ölçekli lipaz üretimi için önemli parametreler toplam yoğunluk, yatak yüksekliği ve havalandırma hızı olarak bulunmuştur.

Smits vd. (1996), *Trichoderma reesei* ile buğday kepeğinden KHF ile amilaz, xylazın ve proteaz üretmişlerdir.

Soccol vd. (1994), *Rhizopus oryzae*'den KHF ile laktik asit üretiminde substrat olarak glikoz ve CaCO_3 içeren çözeltiyle karıştırılmış şeker kamışı posası kullanılmıştır. Hem daldırma hem de KHF arasında karşılaştırma yapılmış KHF'nin daha avantajlı olduğu bulunmuştur.

5.1. Katı Hal Fermantasyonuyla Lipaz Üretimi Alanında Yapılan Bazı Çalışmalar

Kamini vd. (1998), *A.niger*'le substrat olarak susam yağı , pamuk tohumu , pirinç kepeği, buğday kepeği, susam tohumu, keneotu tohumu, şeker kamışı posası, yer fıstığı tohumu, yer fıstığı içi, kahve kabuğu ve arpa kullanarak lipaz üretimi gerçekleştirmişler ve en iyi sonucu susam yağının verdiğini bulmuşlardır.

Bhushan vd. (1994), *Candida BG-55* mayasıyla substrat olarak pirinç ve buğday kepeğiyle lipaz üretimini gerçekleştirdiler. Ve 96 saat sonra (pirinç kepeği+ %10 pirinç kepeği yağı+ mineral tuz) ortamında aktivitenin (buğday kepeği+%10 pirinç kepek yağı+ mineral tuz) ortamına göre daha fazla olduğunu gözlemişlerdir.

Andreas vd. (1999), *Penicillium restrictum*'la katı hal fermantasyonuyla lipaz üretimini çalışmışlardır. Esas besin kaynağı olarak babassu yağ endüstrisi katı atıklarına ek olarak değişik C/N oranlarında pepton, zeytinyağı ve nişasta kullanıldı. En fazla lipaz aktivitesinin kültivasyondan 24 saat sonra %2 zeytinyağıyla zenginleştirilmiş ortamda elde edildiğini ve lipaz aktivitesinin besin kaynağının çeşidine ve miktarına çok

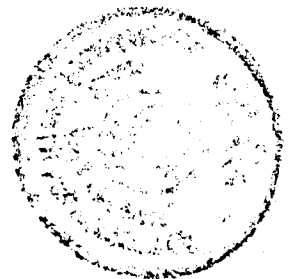


duyarlı olduğunu ve ortamın pH'sının ve proteaz miktarının azalmasıyla arttığını bulmuşlardır .

Smythe ve Drake (1949), *Aspergillus luchuensis* 'le buğday kepeği kullanarak lipaz üretimini incelemişlerdir.

Ul-Haq vd. (2002), *Rhizopus oligosporous* 'la besin kaynağı olarak badem kullanılarak enzim üretimi için optimum büyüme koşullarında lipaz üretimi gerçekleştirmişler. Enzim ekstrasellüler olarak sentezlendi ve daha sonra bu mikroorganizmanın büyük ölçekli çalışmalarda kullanılabilir olduğunu tespit etmişlerdir.

Cordova vd. (1997), Termotabl mantar kültürleri *Rhizomucor pusillus* ve *Rhizopus rhizopodiformis* 'le zeytinyağı keki ve şeker kamışı posası kullanılarak lipaz üretimini çalışmışlardır. Şeker kamışı posası kullanılan ortamda *Rhizomucor pusillus* 'ın gösterdiği aktivite daha fazla olmasına karşın, % 50 şeker kamışı posası ve zeytinyağı keki karışımında ise *Rhizopus rhizopodiformis* 'le aktivitenin daha fazla olduğunu bulmuşlardır.



6. MATERYAL VE METOD

6.1. *Rhizopus arrhizus*'un İnkübasyonu

Bölümümüzün daha önce elinde bulunan *Rhizopus arrhizus* stoklarını yenileyerek çalışmalarımızda kullandık. Üretim için kullanılan besi yerinin bileşimi Tablo 6.1'de verilmiştir.

Hazırlanan besi yerleri bir erlene konulmak suretiyle pH'sı 6'ya ayarlanmıştır. Erlenin ağzı bir pamuk tıpa ve tıpanın üzeri de alüminyum folyo ile kapatılmıştır. Bu şekilde hazırlanan besi yeri 121 °C'de ve 1.2 Bar basınçta 20 dakika süre ile otoklavda steril edilmiştir. Sterillenen agarlı besi yeri yaklaşık 40 °C'ye kadar soğutulmuştur. Ilık, agarlı besi yeri aynı şekilde steril edilen petri kaplarına, steril ortamda 40 ml konulmuş ve katılaşmaya bırakılmıştır. Üretime hazır besi yerine, alevde kor olana kadar ısıtılan bir öze ile *R. arrhizus* ekimi yapılmıştır. Ekimi yapılan petri kapları 30 °C'de 48 saat bekletilerek *R. arrhizus*'un gelişmesi sağlanmıştır.

Tablo 6.1 *R.arrhizus* için agarlı besi yeri bileşimi

Madde	Konsantrasyon (g/L)
Sakkaroz	30
K ₂ HPO ₄	0.5
KH ₂ PO ₄	0.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2
Yeast Ekstrakt	2
Agar	12

6.2. Fermantasyon Ortamı

6.2.1. Buğday Kepeği Kullanılarak Enzim Üretimi

Nem miktarı, bilinen buğday kepeğinin elek analizi yapılmış ve belli boyutlara getirilmiştir (0.15, 0.3, 0.6, 1.18, 2.36 mm). Buğday kepeğinin kimyasal bileşimi Özhan (1971)'den alınmış ve Ek 2'de verilmiştir. Tartılıp erlenlere konulan buğday kepeğinin toplam nem miktarını ayarlamak için musluk suyu ilave edilmiş ve pH ayarlanmamıştır. Erlenlerin ağzı önce pamuk tıpa ve bunun üzeri de alüminyum folyo ile kaplanarak otoklavlanmıştır. Soğuması için beklenen besi yerlerine 1.10^8 spor/ml konsantrasyonunda spor ekim yapılarak mikroorganizma geliştirilmiştir. Maksimum aktivite veren boyut belirlendikten sonra konsantrasyonun etkisi incelenmiştir (%1, %2.5, %5, %7.5, %10) .

Daha sonra maksimum aktivite veren diğer koşullar (çalkalama hızı, başlangıç pH'sı ve spor konsantrasyonu) belirlendi.

Diğer denemelerde; % 5 kepek içeren besi yerine sırasıyla (0.25, 0.5, 1 g/L) $K_2 HPO_4$ ve KH_2PO_4 'ün birlikte, azot kaynağı olarak yeast ekstrakt (1, 2, 4 g/L) , karbon kaynağı olarak (0.25, 0.5, 1, 2 g/L) glikoz ve (0.5, 1, 10 g/L) mısırözü yağı ve ayrıca (0.1, 0.2, 0.4 g/L) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ eklendi. Otoklavlanan besi yerine 1.10^8 spor/ml konsantrasyonunda 800 μ l spor ekimi yapılmıştır. Çalkalama hızı 150 rpm ve sıcaklık 30 °C'ye ayarlanmıştır.

6.2.2. Ay çekirdeği Küspesi Kullanılarak Enzim Üretimi

Fermantasyon ortamında kullanılan ay çekirdeği küspesi Karadeniz Birlik yağ fabrikasından elde edilmiştir. Ay çekirdeği küspesinin bileşimi Ek.3'de verilmektedir.

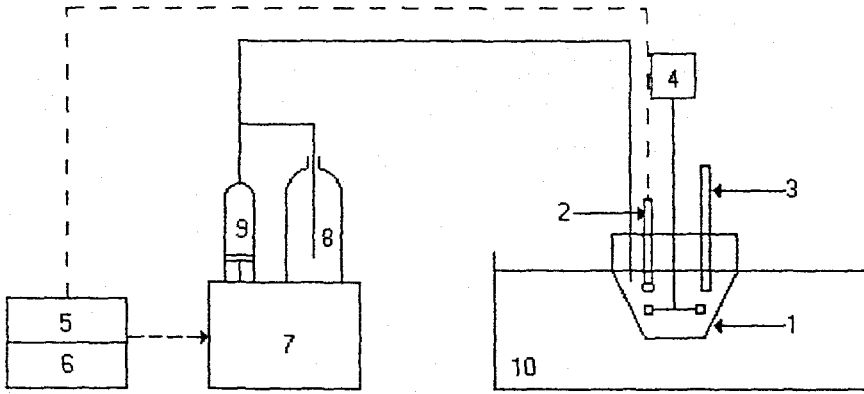
Buğday kepeğinde yapılan çalışmaların aynısı ay çekirdeği küspesi içinde yapıldı. Yalnız burada karbon kaynağı olarak mısırözü yağı, ay çekirdeği küspesinin kendi bünyesinde yağ olduğundan kullanılmadı.

6.3. Analitik Ölçüm Metotları

Enzim aktivitesinin ölçüm çalışmalarında 30 ml sıvı kapasiteli camdan yapılmış bir tepkime kabı, pH'yı ölçmek için pH metre, piston tipli pompa, karıştırıcı ve su banyosu kullanılmıştır. Karıştırma, iki kanatlı, hız ayarlı bir karıştırıcı ile yapılmıştır. Tepkime kabının üstü PVC kapakla kapatılmış olup, kapak üzerinde NaOH, karıştırıcı mil, pH elektrodu ve enzim girişi bulunmaktadır. Tepkime kabı sıcaklığı kontak termometre sistemiyle kontrol edilen 35 °C'deki bir su banyosuna yerleştirilmiştir. Hidroliz tepkimesi sonucu oluşan yağ asitlerini nötrleştirerek, ortam pH'sını sabit tutmak için belirli zamanlarda pompa çalıştırılarak, ortama konsantrasyonu bilinen NaOH pompalanmıştır, Şekil (6.2).

6.3.1. Enzim Aktivitesi

Enzim analizi pH-stat metoduna göre yapılmıştır. Tepkime ortamı tributirin, NaCl, CaCl, NaOH ve butirik asit içerir, Ortamın pH'sı 6.5'e ayarlanır. Enzim çözeltisi tepkime kabına gönderilerek tepkime başlatılır. Tepkime sonucu oluşan yağ asidini



Şekil 6.2. Enzim Aktivitesi Ölçmek İçin Kullanılan Sistem. (1) 30 ml'lik reaktör, (2) pH probu, (3) Termometre, (4) Motor, (5) pH kontrol ünitesi, (6) Yazıcı, (7) Düzgün integratör, (8) NaOH stok çözeltisi, (9) Pompa, (10) Su banyosu.

nötrleştirmek için belli aralıklarla gönderilen NaOH miktarı okunur. Başlangıç tepkime hızının doğru olarak bulunabilmesi için çok kısa sürelerle NaOH eklenir. Başlangıç tepkime hızı, zamana karşı geçirilen hacim eğrisinin ilk eğiminden hesaplanır.

6.4. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

- a) Enzim Çözeltisi: Kültivasyondan alınan numuneler el blendırında iyice parçalanarak kullanılmıştır.
- b) Butirik Asit Çözeltisi: Enzim aktivitesi tepkime kabı için 0.5 N konsantrasyonunda butirik asit çözeltisi hazırlanmıştır.
- c) NaOH Çözeltileri: Hidroliz tepkimesi için 0.01 N ve enzim analizi tepkime kabı için 0.5 N NaOH hazırlanmıştır.
- d) Tuz Çözeltisi: 80.06g NaCl ve 4.139g $\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ saf suda çözülerek litreye tamamlanmıştır.
- e) Enzim aktivitesi Tepkime Karışımının Hazırlanması: Tepkime kabı içine toplam sulu evre hacminin %10'u kadar tuz çözeltisi, %0.5'i 0.5 N NaOH, %0.5'i 0.5 N butirik asit, % 1 tributirin eklenmiştir. Tepkime kabı çalışma hacmi 30 ml'dir.

7. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Rhizopus arrhizus'dan katı hal fermantasyonuyla lipaz üretimi 50 ml fermantasyon sıvısının yer aldığı 250 ml'lik erlenlerde gerçekleştirilmiştir. Erlenler sürekli olarak çalkalayıcıda çalkalanmıştır. Çalkalayıcı dairesel dönmekte olup hız ve sıcaklık ayarı yapılabilmektedir.

Katı hal fermantasyonuyla (KHF), ticari önem taşımayan fakat besin değeri yüksek olan buğday kepeği ve ay çekirdeği küspesi karbon kaynağı olarak kullanılmıştır. Mikroorganizmanın hayatsal faaliyetleri için gerekli olan diğer minerallerde çeşme suyundan temin edilmiştir.

Çalışmada öncelikle buğday kepeği elek analizinden geçirildi ve buğday kepeği ortamında maksimum aktivite veren boyut ve konsantrasyon daha sonra ise maksimum aktivite veren diğer koşullar (çalkalama hızı, başlangıç pH'sı ve spor konsantrasyonu) belirlendi. Bu bilgilerin ışığı altında buğday kepeği ortamına ilave edilen çeşitli karbon kaynaklarının, tuzların ve azot kaynağının lipaz üretimine etkisi incelenmiştir.

Buğday kepeği için yapılan çalışmaların aynısı ay çekirdeği küspesi içinde tekrar edildi.

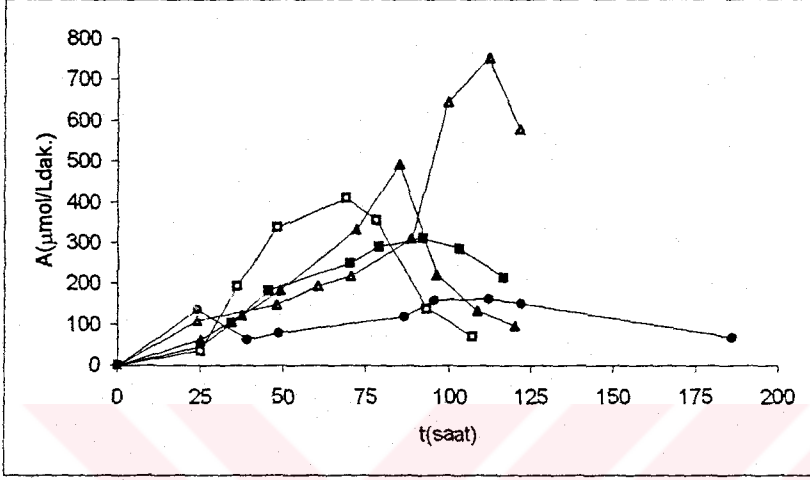
7.1. Buğday Kepeği

7.1.1. Kepek Boyutunun Etkisi

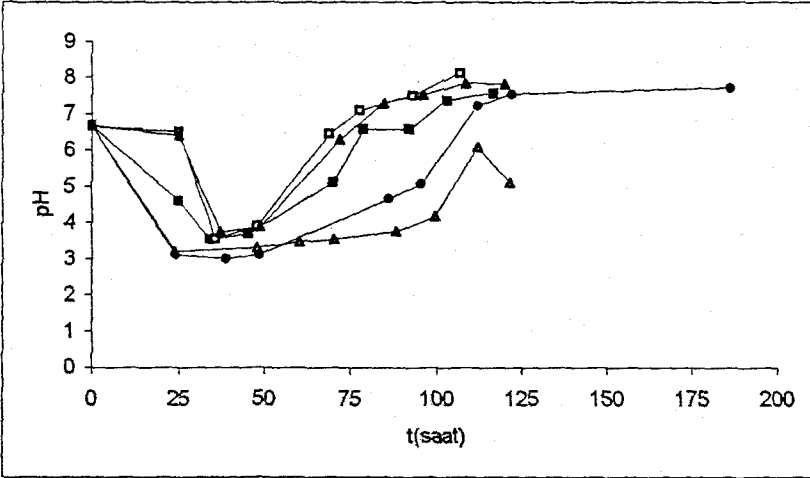
Filamentel halde büyüyen *Rhizopus arrhizus* gibi mikroorganizmalar için elbette ki kepek boyutu önemli bir parametredir. Bunun için 5 farklı kepek boyutunun (2.36 mm, 1.18 mm, 0.6 mm, 0.3 mm, 0.15 mm) lipaz üretimine etkisi incelendi ve sonuçlar Şekil 7.1, 7.2 ve 7.3'de verilmektedir.

Şekil 7.1'de farklı kepek boyutlarının 50 g/L konsantrasyonunda enzim üretiminin zamanla değişimi görülmektedir. Şekilden de görüldüğü gibi en yüksek aktivite (751.9 $\mu\text{mol/L.dk}$) 0.3 mm kepek boyutu kullanıldığında olmaktadır. Daha küçük ve daha büyük kepek boyutlarında enzim aktivitesi azalmaktadır. Katı hal fermantasyonunda böyle bir optimum tanecik büyüklüğünün olması şu şekilde açıklanabilir. Çok

küçük taneciklerin kullanılması durumunda aktif yüzey alanı çok büyük olmasına rağmen gözeneklilik çok küçüktür. *Rhizopus arrhizus* gibi filamentel şekilde büyüyen mikroorganizmalar gözeneklere girememekte ve dolayısıyla substratla yeterli temas edememektedir.



Şekil 7.1. Farklı kepek boyutlarında enzim üretiminin zamanla değişimi (K.H=150 rpm, T=30°C, başlangıç pH=6.7, kepek kons.=50g/L, kepek boyutu (mm) = ●:0.15, △:0.3, ▲:0.6, □:1.18, ■:2.36)



Şekil 7.2. Farklı kepek boyutlarında ortam pH'sının zamanla değişimi (K.H=150 rpm, T=30°C, başlangıç pH=6.7, kepek kons.=50g/L, kepek boyutu (mm) = ●:0.15, △:0.3, ▲:0.6, □:1.18, ■:2.36)

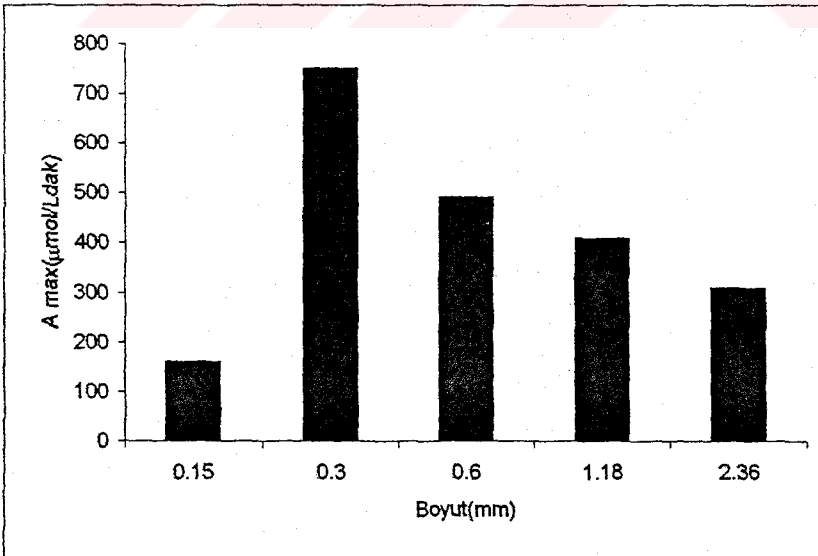


Şekil 7.2’de farklı kepek boyutlarında ortam pH’sının zamanla değişimi gösterilmektedir.Şekilden de görüldüğü gibi ortam pH’sı çok fazla düşmekte ve pH değerinin yükselmesi için çok uzun zaman geçmektedir. 2.36mm, 1.18mm ve 0.6mm’lik kepek boyutları için yaklaşık 50 saat sonra pH değeri yükselmekte, 0.15mm ve 0.3mm’lik kepek boyutlarının pH değerinin yükselmesi için ise biraz daha fazla süre gerekmektedir.

Şekil 7.3’de ise farklı kepek boyutlarında maksimum aktivite değerleri görülmektedir. Buradan da, 0.3 mm kepek boyutunun diğer boyutlara göre fazla olan aktivitesi açık bir şekilde görülmektedir.

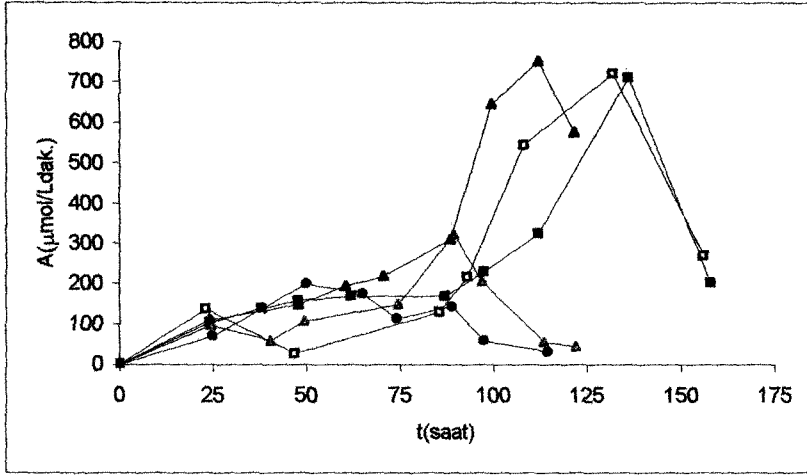
7.1.2. Kepek Konsantrasyonunun Etkisi

Kepek konsantrasyonunun etkisini görebilmek için beş farklı kepek konsantrasyonu (10, 25, 50, 75, 100 g/L) çözeltiler hazırlandı ve enzim üretiminin zamanla değişimi Şekil 7.4’de verilmektedir.

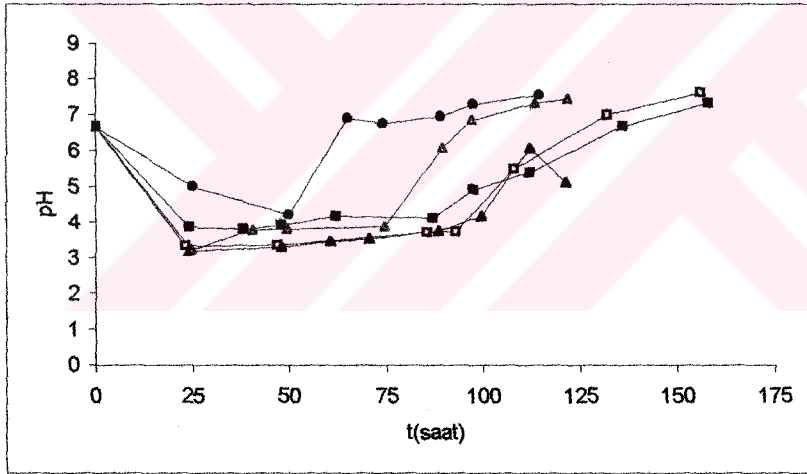


Şekil 7.3 Farklı kepek boyutlarındaki maksimum enzim üretimi (K.H.=150 rpm, T=30°C, başlangıç pH=6.7, kepek kons.=50g/L)





Şekil 7.4 Farklı kepek konsantrasyonlarında enzim üretiminin zamanla değişimi (K.H=150 rpm, T=30°C, pH=6.7, kepek boyutu = 0.3 mm, kepek konsantrasyonu (g/L) = ●:10, △:25, ▲:50, □:75, ■:100)



Şekil 7.5 Farklı kepek konsantrasyonlarında ortam pH'sının zamanla değişimi (K.H=150 rpm, T=30°C, başlangıç pH=6.7, kepek boyutu = 0.3 mm, kepek konsantrasyonu (g/L)= ●:10, △:25, ▲:50, □:75, ■:100)

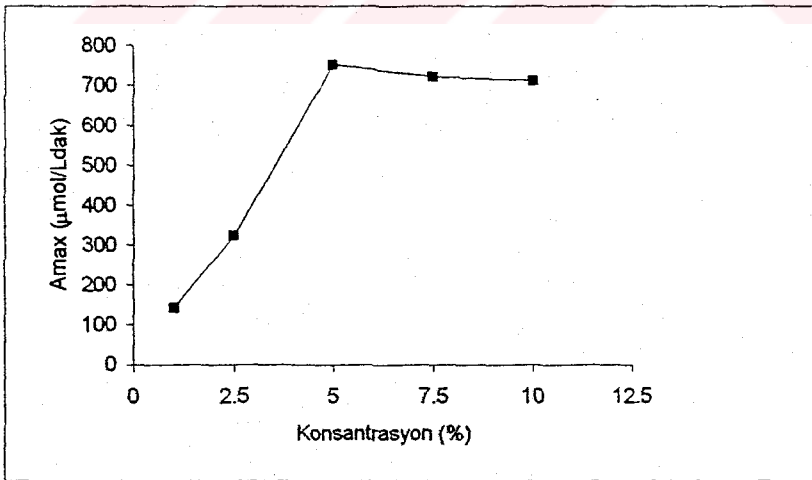
Şekil 7.4'den de görüldüğü gibi maksimum aktivite 50 g/L (%5 w/v) kepek konsantrasyonunda yani % 95 su oranında olmaktadır. Düşük kepek konsantrasyonunda enzim aktivitesi çok düşüktür. 50 g/L kepek konsantrasyonundan daha yüksek değerlerde ise ortam viskoz olmakta ve bu nedenle de mikroorganizmalar enzimi sentezleyecek uygun ortam bulamamış olabilirler.

Şekil 7.5'de farklı kepek konsantrasyonlarında ortam pH'sının zamanla değişimi verilmektedir. Şekilden de görüldüğü gibi ortam pH'sı çok fazla düşmekte, yüksek konsantrasyonlarda (50, 75 ve 100 g/L) ortam pH'sının yükselmesi için uzun zaman gerekmektedir.

Şekil 7.6'da farklı konsantrasyonlara karşı maksimum aktiviteler görülmektedir. Burada da maksimum aktivite veren konsantrasyonun 50g/L (%5) olduğu net bir şekilde görülmektedir. % 5'den küçük konsantrasyonlarda aktivite çok düşük, daha büyük konsantrasyonlarda ise aktivitede fazla bir değişim görülmemiştir.

7.1.3. Başlangıç pH'sının Etkisi

Bütün fermentasyon sistemlerinde olduğu gibi *Rhizopus arrhizus* da öncelikle pH olmak üzere başlangıç ve çevre şartlarından etkilenecektir. pH değeri hem mikroorganizma gelişmesinde hem de enzim üretiminde etkili olacaktır. Başlangıç pH'sının enzim üretimine etkisini görebilmek için yapılan deney sonuçları Şekil 7.7, 7.8 ve 7.9'da verilmektedir.



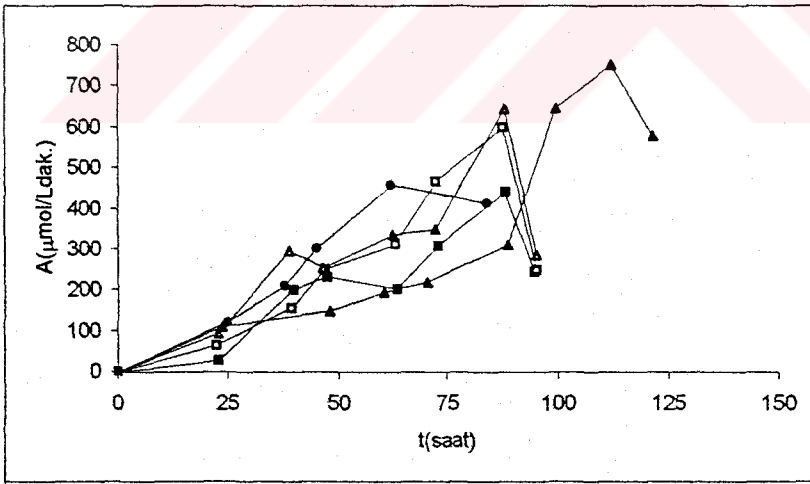
Şekil 7.6 Buğday kepeği konsantrasyonu ile maksimum maksimum aktivite değerlerinin değişimi (K.H.=150 rpm, T=30°C, başlangıç pH=6.7, kepek boyutu = 0.3, kepek kons.=50g/L)



Farklı başlangıç pH'larında enzim aktivitesinin zamanla değişimi Şekil 7.7'de verilmektedir. Burada maksimum aktivite veren pH'nın ortamın kendi doğal pH'sı olan 6.7 olduğu görülmektedir. Bu pH'da maksimum aktiviteye 100. ve 125. saatler arasında ulaşılmaktadır.

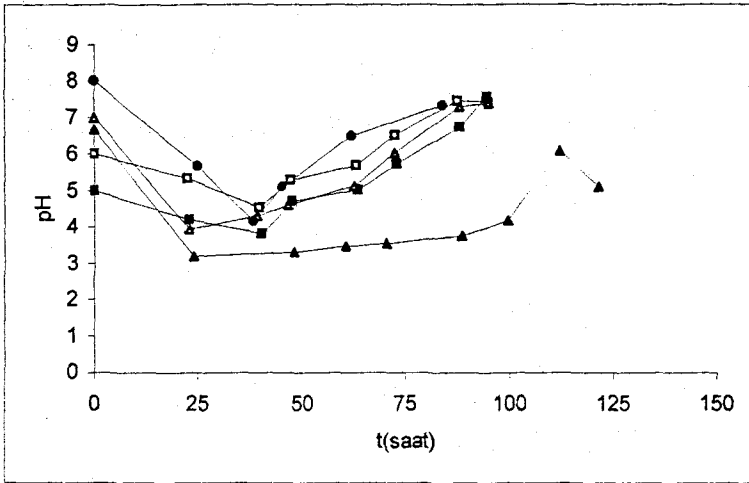
Şekil 7.8'de ise ortam pH'sının zamanla değişimi gösterilmektedir. Şekilden de görüldüğü gibi başlangıç pH'sı ilk 24 saatte düşüp daha sonra bir yükseliş göstermektedir. Ortamın doğal pH'sı 6.7'de ise gecikmeli bir şekilde yükseliş göstermektedir. Bu durum onun maksimum aktivite vermesine sebep olmuş olabilir.

Şekil 7.9'da farklı başlangıç pH'larının maksimum aktivite değerleri gösterilmektedir. Görüldüğü gibi en yüksek enzim aktivitesi ortamın doğal pH'sı olan 6.7'de elde edilmiştir. Ayrıca nötre yakın ortamlarda aktivitenin yüksek olduğu gözlenmektedir.

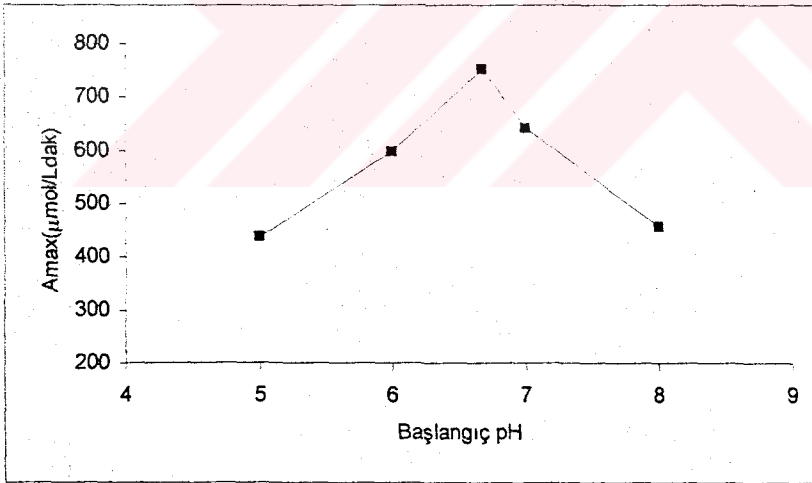


Şekil 7.7 Farklı başlangıç pH'larında enzim üretiminin zamanla değişimi (K.H=150 rpm, T=30°C, kepek boyutu = 0.3 mm, başlangıç pH'sı: ■:5, □:6, ▲:6.7, △:7, ●:8)





Şekil 7.8 Buğday kepeği için farklı başlangıç pH'larında ortam pH'sının zamanla değişimi ($T=30^{\circ}\text{C}$, kepek boyutu = 0.3 mm, kepek kons.=50 g/L, başlangıç pH'sı: ■:5, □:6, ▲:6.7, △:7, ●:8)



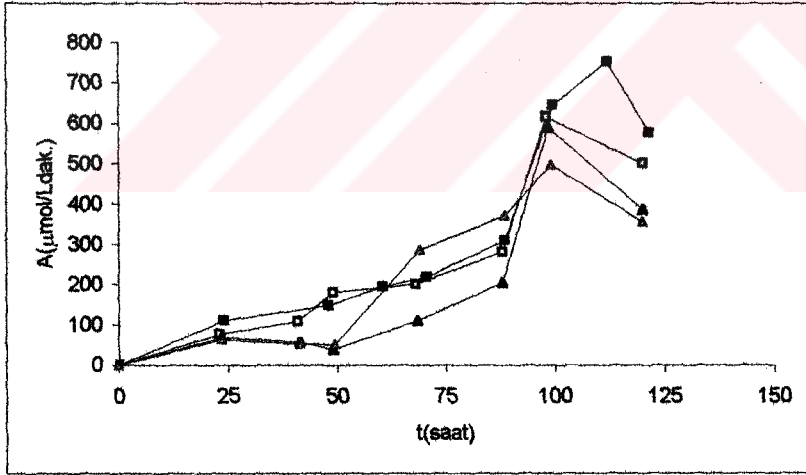
Şekil 7.9 Buğday kepeği için farklı başlangıç pH'larında maksimum enzim üretimi (K.H=150 rpm, $T=30^{\circ}\text{C}$, kepek boyutu = 0.3 mm, kepek kons. =50 g/L)



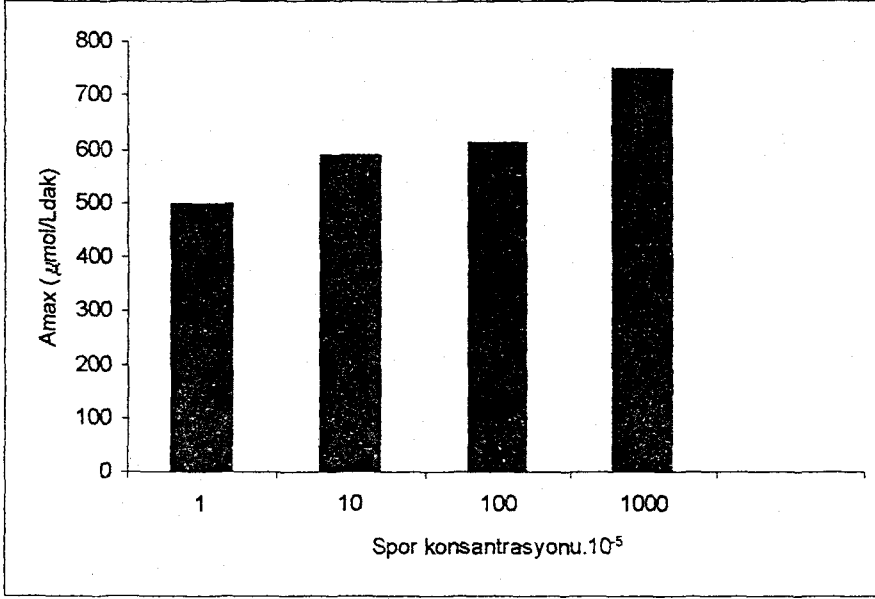
7.1.4. Başlangıç Spor (İnokulum) Konsantrasyonunun Etkisi

Bu çalışmada dört farklı spor konsantrasyonunun enzim üretimine etkisi incelendi ve sonuçlar Şekil 7.10, 7.11 ve 7.12’de verilmektedir. Başlangıç spor konsantrasyonu 1/1, 1/10, 1/100, 1/1000 oranında seyreltildi ve spor konsantrasyonu “Toma” lamuna (hemasitometre) konup, mikroskopta sayıldı ve spor konsantrasyonu spor/ml olarak hesaplandı.

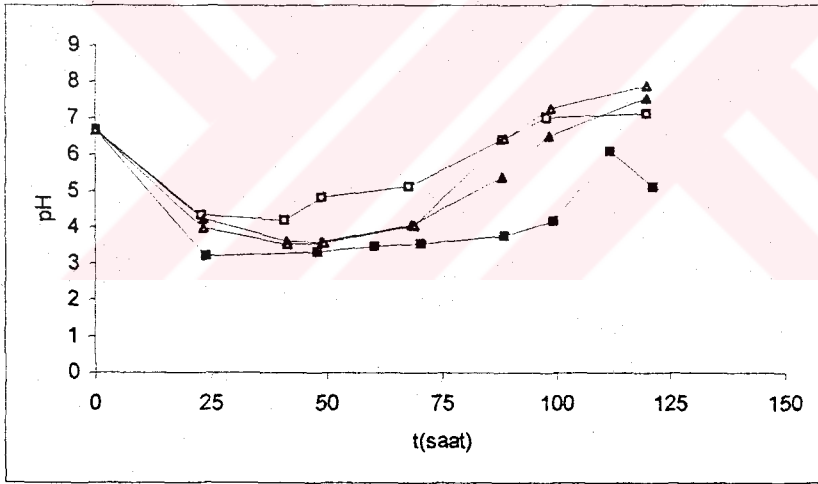
Şekil 7.10’da farklı başlangıç spor konsantrasyonlarının enzim üretiminin zamanla değişimi gösterilmektedir. En yüksek enzim aktivitesi 1.10^8 spor/ml spor konsantrasyonunda gözlenmektedir. Spor konsantrasyonu düştükçe maksimum aktivite düşmektedir. Bu durum Şekil 7.11’de açık bir şekilde görülmektedir.



Şekil 7.10 Kepek için farklı başlangıç spor kons.'larında enzim üretiminin zamanla değişimi (K.H=150 rpm, T=30°C, başlangıç pH'sı = 6.7, kepek boyutu = 0.3 mm, kepek kons.=50 g/L, spor kons. (spor/ml) = $\Delta: 1.10^5$, $\blacktriangle: 1.10^6$, $\square: 1.10^7$, $\blacksquare: 1.10^8$)



Şekil 7.11 Kepek için farklı başlangıç spor kons.'larında maksimum enzim üretimi (K.H=150 rpm, T=30°C, başlangıç pH'sı=6.7, kepek boyutu = 0.3 mm, kepek kons.=50 g/L)



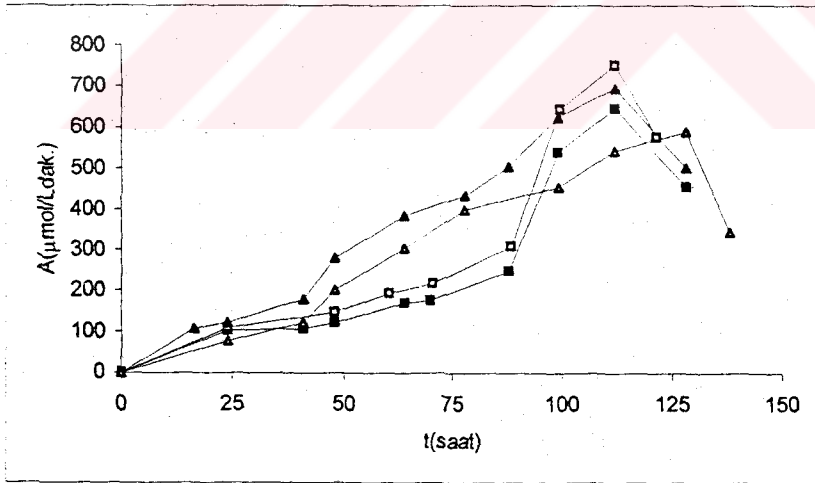
Şekil 7.12 Buğday kepeği için farklı başlangıç spor kons.'larında ortam pH'sının zamanla değişimi (K.H=150 rpm, T=30°C, başlangıç pH'sı=6.7, kepek boyutu = 0.3 mm, kepek kons.=50 g/L, spor kons. (spor/ml) = Δ:1.10⁵, ▲:1.10⁶, □:1.10⁷, ■:1.10⁸)

Şekil 7.12'de ise farklı başlangıç spor konsantrasyonlarında ortam pH'sının zamanla değişimi gösterilmektedir.

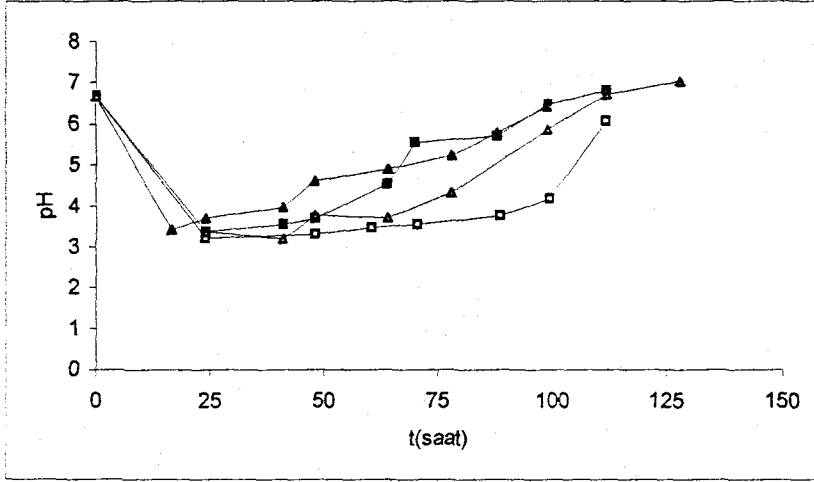
7.1.5. Karıştırma Hızının Etkisi

Fermentasyonda mikroorganizmanın metabolik davranışını etkileyecek önemli parametrelerden biri de karıştırma hızıdır. Karıştırma hızının lipaz enzimi üretimi üzerine etkisi Şekil 7.13’de verilmektedir. 75, 100, 150 ve 200 rpm gibi dört farklı hızda yapılan deneylerde, düşük karıştırma hızında ürün miktarının az oluşu, aerobik ortamın yeterli oranda olmadığını göstermektedir. Mikroorganizmanın faaliyetlerini sürdürmesi için gerekli olan oksijenin sağlanamadığı söylenebilir. Yüksek karıştırma hızı ise, mikroorganizmanın morfolojik yapısını olumsuz yönde etkilemektedir. Bu durum için mikroorganizmanın yüksek karıştırma hızında gelişimini tam olarak tamamlayamadığı söylenebilir. 150 rpm karıştırma hızında ise, lipaz enzimi üretimi için optimum şartlar sağlanmaktadır.

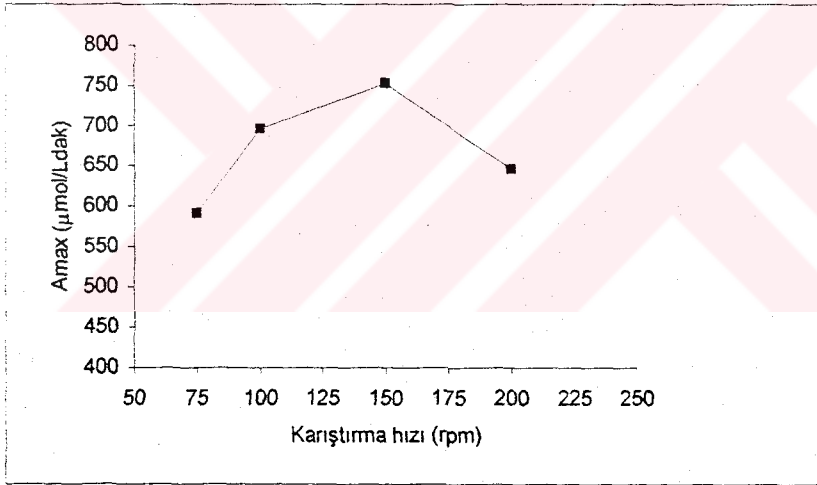
Farklı karıştırma hızlarında ortam pH’sının zamanla değişimi Şekil 7.14’de görülmektedir. 25. saate kadar ortam pH’sında hızlı bir düşüş olmuş ve bu saatten sonra hepsinde uzun süreli yükseliş gözlenmiştir.



Şekil 7.13 Buğday kepeği için farklı karıştırma hızlarında enzim miktarının zamanla değişimi ($T=30^{\circ}\text{C}$, başlangıç pH'sı = 6.7, kepek boyutu = 0.3 mm, kepek kons.=50 g/L, karıştırma hızı (rpm) = Δ :75, $\blacktriangle$:100, $\square$:150, $\blacksquare$:200)



Şekil 7.14 Kepek için farklı karıştırma hızlarında ortam pH'sının zamanla değişimi ($T=30^{\circ}\text{C}$, başlangıç pH'sı = 6.7, kepek boyutu = 0.3 mm, kepek kons.=50 g/L, karıştırma hızı (rpm) = Δ :75, $\square$:100, $\diamond$:150, $\circ$:200)



Şekil 7.15 Kepek için farklı karıştırma hızlarının maksimum aktivite değerleri ($T=30^{\circ}\text{C}$, başlangıç pH'sı = 6.7, kepek boyutu = 0.3 mm, kepek kons.=50 g/L)

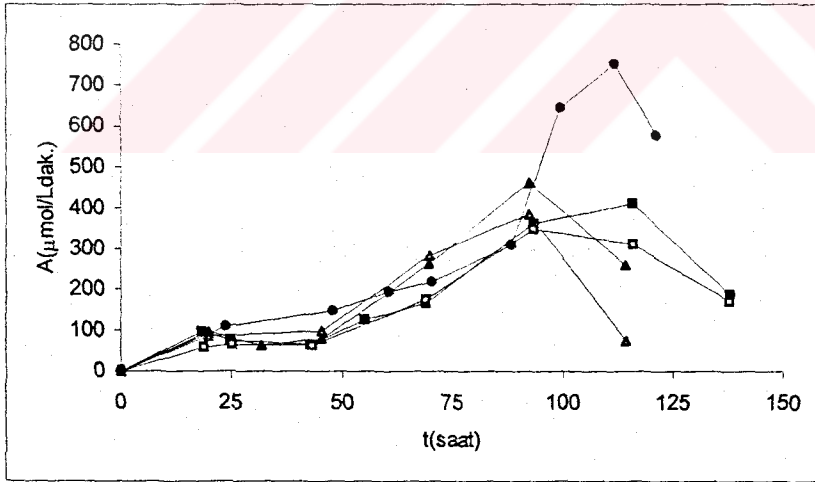
Şekil 7.15'de her bir karıştırma hızının maksimum aktivite değerleri görülmektedir. Buradan da en yüksek aktivite değerinin 150 rpm'de gerçekleştiği açıkça görülmektedir.

7.1.6 Kepek Ortamına Katkı Maddeleri İlavesi

K.H.F ile elde edilecek ürün miktarını etkileyen önemli parametrelerden biride ortama eklenen katkı maddeleridir. Bu çalışmada glikoz, yeast ekstrakt, mısır özü yağı, K_2HPO_4 ve KH_2PO_4 ve $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ katkı maddesi olarak kullanıldı.

7.1.6.1 Glikoz İlavesinin Etkisi

Başlangıç glikoz konsantrasyonunun enzim üretimi üzerine etkisini görebilmek için 0.25, 0.5, 1 ve 2 g/L glikoz konsantrasyonları kullanılmıştır. Deneylerden elde edilen sonuçlar Şekil 7.16'da gösterilmektedir. Şekilde görüldüğü gibi glikoz konsantrasyonu enzim üretimi üzerine represyon etkisi yapmıştır. Katkısız ortamın aktivitesinin daha fazla olduğu görülmektedir. Glikozun represyon etkisi birçok fermantasyon prosesinde gözlenmektedir (Gürsoy,1991; Ünsaçarer 1998).



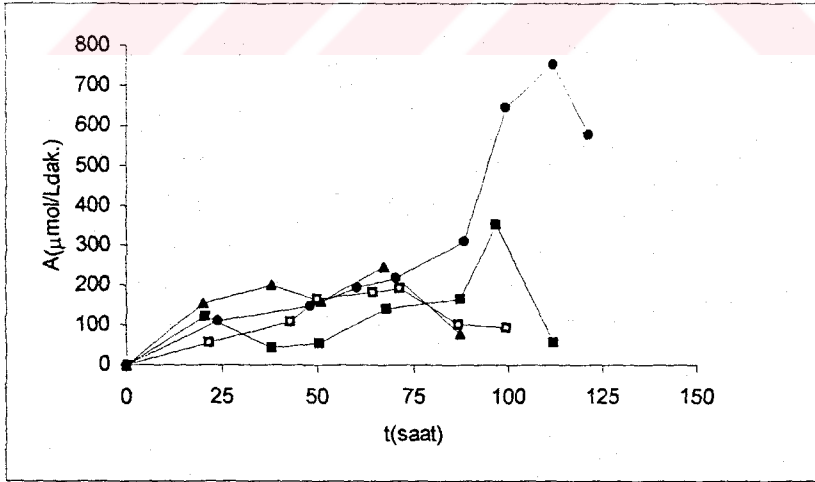
Şekil 7.16 Farklı glikoz konsantrasyonlarında enzim üretiminin zamanla değişimi (K.H = 150 rpm, $T=30^{\circ}C$, başlangıç pH'sı = 6.7, kepek boyutu = 0.3 mm, kepek kons.=50 g/L, glikoz kons. (g/L) = ●:kontrol, ■:0.25, □:0.5, ▲:1, Δ:2)

7.1.6.2 Yeast Ekstrakt İlavesinin Etkisi

Bu çalışmada da azot kaynağı olarak yeast ekstrakt'ın fermantasyon ortamına etkisi incelendi. Bunun için 1,2 ve 4 g/L yeast ekstrakt konsantrasyonları kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 7.17'de verilmektedir. Burada katkısız ortama göre aktivitenin çok düşük olduğu ve ortama katılan yeast ekstrakt konsantrasyonlarının fermantasyon prosesinde olumsuz etki yaptığı açıkça görülmektedir. Ortama katılan yeast ekstrakt ortamın karbon azot dengesini bozduğundan represyon etkisi yapmıştır.

7.1.6.3 İndükleyici Etkisi

Fermantasyon çalışmalarında besi yerine katılan bazı maddeler mikroorganizmayı uyarak enzim sentezini başlatabilir yada hızlandırabilir. Özellikle mikroorganizmadan elde edilecek enzim substratının, besi yerine konulmasıyla söz konusu enzimin biyosentezi hızlandırılabilir. Bu çalışmada ise indükleyici olarak sıvı mısır özü yağı

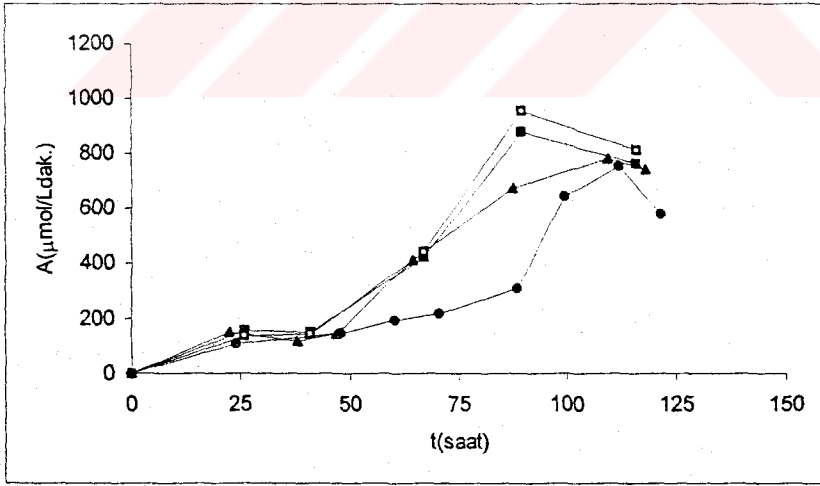


Şekil 7.17 Farklı yeast ekstrakt konsantrasyonlarında enzim üretiminin zamanla değişimi (K.H = 150 rpm, T=30°C, başlangıç pH'sı = 6.7, kepek boyutu = 0.3 mm, kepek kons.=50 g/L, yeast ekstrakt kons. (g/L) = ●:kontrol, ■:1, □:2, ▲:4)

kullanılmaktadır. Şekil 7.18’de farklı sıvı mısırözü yağı konsantrasyonlarında enzim üretiminin zamanla değişimi gösterilmektedir. Bunun için 0.5, 1 ve 10 g/L mısırözü yağı konsantrasyonları üzerinde çalışıldı.

Şekilde görüldüğü gibi katkısız ortamdaki aktivitenin 751 $\mu\text{mol/L.dak}$ olarak ölçülürken, 1 g/L yağ konsantrasyonunun aktivitesi ise 955 $\mu\text{mol/L.dak}$ olarak ölçülmüştür. Bu durumdan yağın mikroorganizmalar tarafından substrat olarak tüketilmesinin yanısıra, enzim sentezi prosesinde indükleyici etki olarak görev yaptığı görülmüyor.

Ayrıca artan yağ konsantrasyonu ile aktivite azalmaktadır. Bu durum, artan yağ konsantrasyonu ile ortamın viskozitesinin artmasından veya substratın fazlasının inhibitör etki yapmasından kaynaklanabilir.



Şekil 7.18 Farklı sıvı mısır özü yağı konsantrasyonlarında enzim üretiminin zamanla değişimi (K.H = 150 rpm, T=30°C, başlangıç pH'sı = 6.7, kepek boyutu = 0.3 mm, kepek kons.=50 g/L, mısır özü yağı kons. (g/L) = ●:kontrol, ■:0.5, □:1, ▲:10)

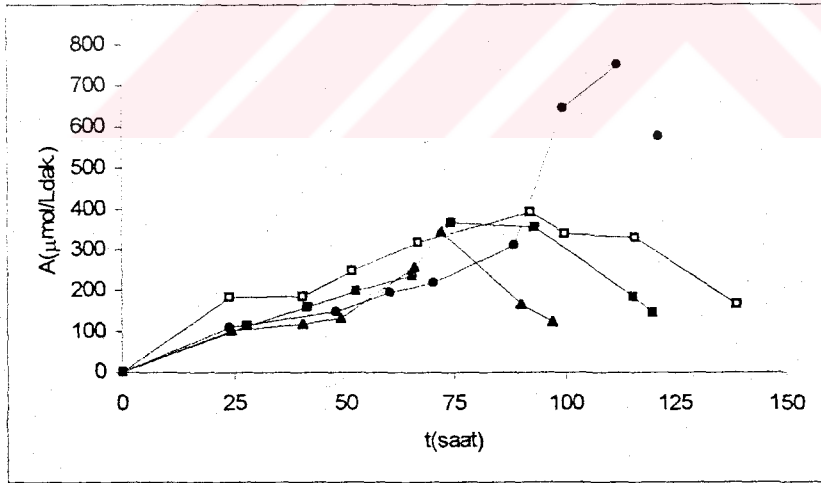


7.1.6.4. K_2HPO_4 ve KH_2PO_4 İlavesinin Enzim Üretimine Etkisi

Bu çalışma için 0.25, 0.5 ve 1 g/L konsantrasyonlarında K_2HPO_4 ve KH_2PO_4 kullanılarak yapılan deneylerden elde edilen sonuçlar Şekil 7.19'da verilmektedir. Şekilden de açık bir şekilde görüleceği gibi ortama katılan K_2HPO_4 ve KH_2PO_4 enzim üretimi üzerine inhibisyon etkisi yapmıştır.

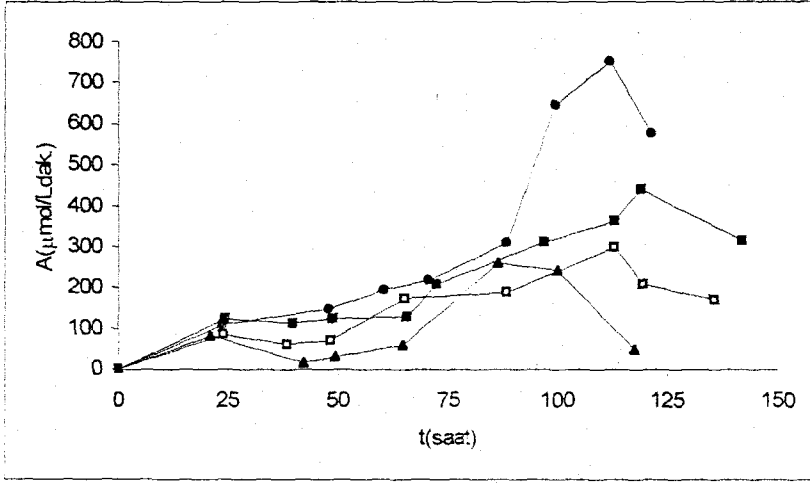
7.1.6.5. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ İlavesinin Enzim Üretimine Etkisi

Bu çalışmada 0.1, 0.2 ve 0.4 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ konsantrasyonları kullanıldı. Deneylerden elde edilen sonuçlar Şekil 7.20'de verilmektedir. Şekilden de görüldüğü gibi katkısız ortamdaki aktivite daha yüksektir.



Şekil 7.19 Farklı K_2HPO_4 ve KH_2PO_4 konsantrasyonlarında enzim üretiminin zamanla değişimi (K.H = 150 rpm, $T=30^\circ C$, başlangıç pH'sı = 6.7, kepek boyutu = 0.3 mm, kepek kons.=50 g/L, K_2HPO_4 ve KH_2PO_4 kons. (g/L) = ●:kontrol, ■:0.25, □:0.5, ▲:1)





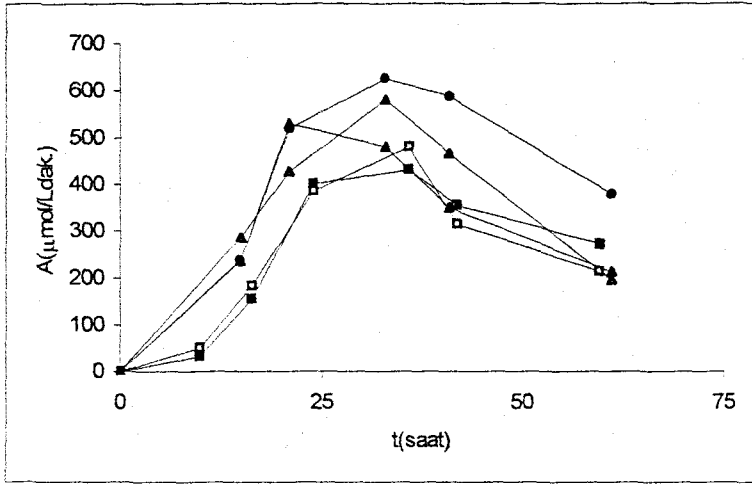
Şekil 7.20 Farklı $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ konsantrasyonlarında enzim üretiminin zamanla değişimi (K.H = 150 rpm, $T=30^\circ C$, başlangıç pH'sı = 6.7, kepek boyutu = 0.3 mm, kepek kons.=50 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ kons. (g/L) = ●:kontrol, ■:0.1, □:0.2, ▲:0.4)

7.2. Ay Çekirdeği Küspesi

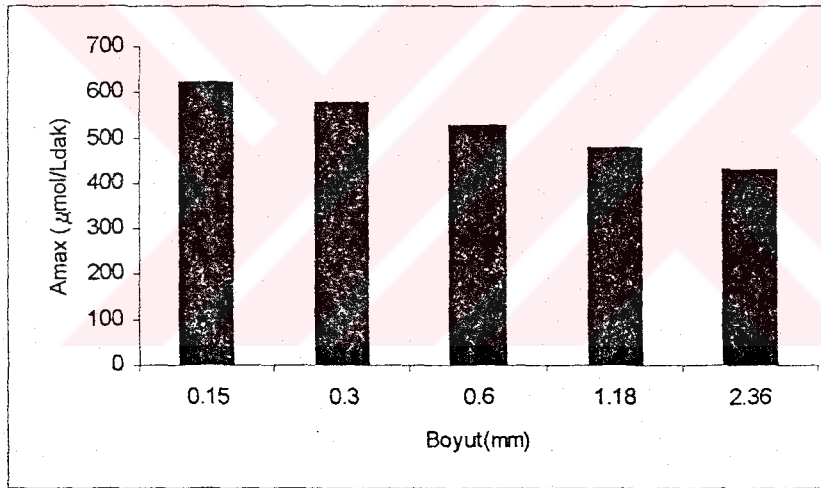
7.2.1 Ay Çekirdeği Küspesi Boyutlarının Enzim Üretimi Üzerine Etkisi

Rhizopus arrhizus filamental halde büyüdüğünden boyut önemli bir parametredir. Ay çekirdeği küspesi ile ilgili çalışmamızda önce ay çekirdeği küspesi bir elek analizinden geçirildi. Çalışmamızda beş farklı boyut (2.36 mm, 1.18 mm, 0.6 mm, 0.3 mm ve 0.15 mm) kullanıldı. Farklı ay çekirdeği küspesi boyutlarının zamanla gösterdiği aktivite Şekil 7.21'de görülmektedir. Şekilden de görüldüğü gibi en yüksek aktivite en küçük boyut olan 0.15 mm'de elde edilmiştir. 33. saatte elde edilen aktivitenin sayısal değeri 625 $\mu mol/Ldak$ 'dır. Boyut büyüdükçe maksimum aktivite değeri de düşmektedir. Bu durum Şekil 7.22'de görülmektedir.





Şekil 7.21 Farklı ay çekirdeği küspesi boyutlarında enzim üretiminin zamanla değişimi (K.H = 150 rpm, T=30°C, başlangıç pH'sı = 6.7, ay çekirdeği küspesi kons.=50 g/L, ay çekirdeği küspesi boyutu (mm) = ●:0.15, △:0.3, ▲:0.6, □:1.18, ■:2.36)

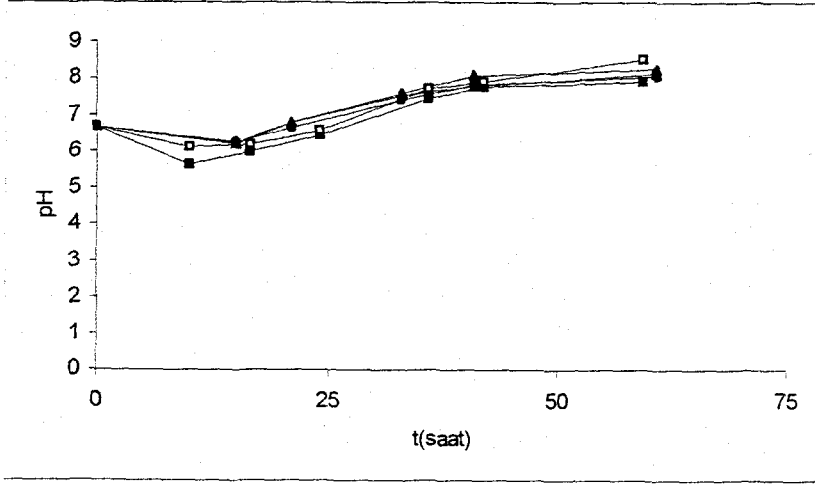


Şekil 7.22 Farklı ay çekirdeği küspesi boyutlarında maksimum enzim üretimi (K.H = 150 rpm, T=30°C, başlangıç pH'sı = 6.7, ay çekirdeği küspesi kons.=50 g/L)

Ayrıca maksimum aktiviteler 25. ve 36. saatler arasında görülmekte ve daha sonra da enzim aktivitesi azalmaya başlamaktadır.

Şekil 7.23'de farklı ay çekirdeği küspesi boyutlarında ortam pH'sının zamanla değişimi görülmektedir. Ortam pH'sının bütün boyutlar için değişimi aynı olmakta, önce çok az bir düşüş sonra yükseliş görülmektedir.





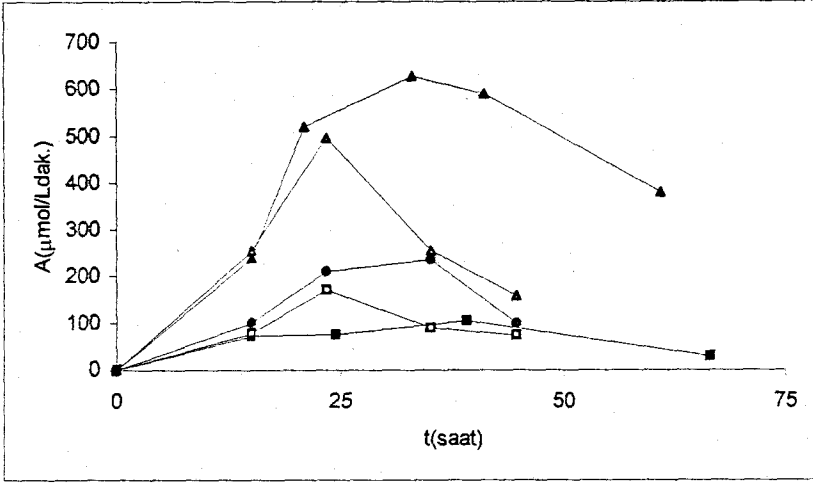
Şekil 7.23 Farklı ay çekirdeği küspesi boyutlarında ortam pH'sının zamanla değişimi (K.H = 150 rpm, T=30°C, başlangıç pH'sı = 6.7, ay çekirdeği küspesi kons.=50 g/L, ay çekirdeği küspesi boyutu (mm) = ●:0.15, △:0.3, ▲:0.6, □:1.18, ■:2.36)

7.2.2 Ay Çekirdeği Küspesi Konsantrasyonunun Etkisi

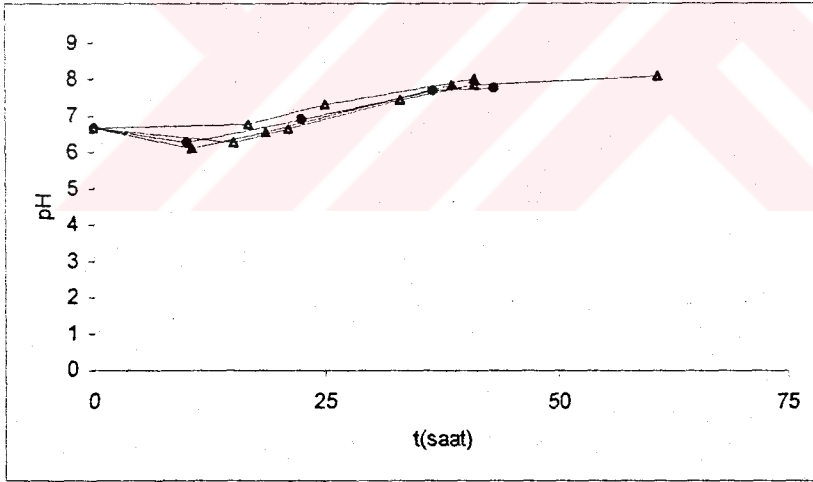
Ay çekirdeği küspesi konsantrasyonunun lipaz üretimi üzerine etkisini görebilmek için 0.15 mm ay çekirdeği küspesi kullanarak beş farklı konsantrasyon (10, 25, 50, 75, 100 g/L) kullanıldı. Bununla ilgili grafikler Şekil 7.24, 7.25 ve 7.26'da verilmektedir.

Şekil 7.24'de farklı ay çekirdeği küspesi konsantrasyonlarında aktivitenin zamanla değişimi gösterilmektedir. En yüksek aktivite 50 g/L yani %5 ay çekirdeği küspesi konsantrasyonunda elde edilmiştir, 100 ve 75 g/L ay çekirdeği küspesi konsantrasyonlarında ise enzim aktivitesi çok düşmüştür. Bunun nedeni ortamın fazlaca viskoz olması ve mikroorganizmanın enzim üretecek ortam bulamamasıdır.

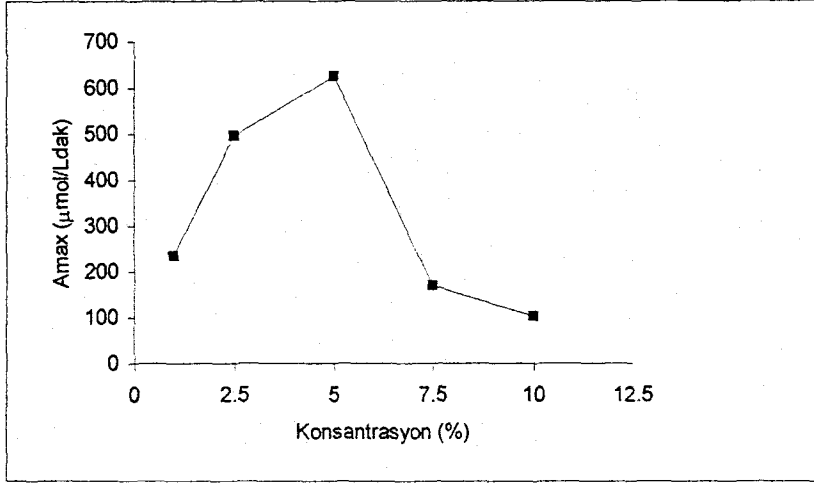
Şekil 7.25'de farklı ay çekirdeği küspesi konsantrasyonlarında ortam pH'sının zamanla değişimi görülmektedir. Bu grafikte 100 ve 75 g/L ay çekirdeği küspesi konsantrasyonları için pH değişimi verilmemiştir. Bunun nedeni ise ortamın çok katı olmasından dolayı pH değerinin ölçülememesidir. Diğer konsantrasyonlar için ise pH'nın zamanla değişimi birbirine çok benzemektedir. Öncelikle bir düşüş sonra yükseliş gözlenmektedir.



Şekil 7.24 Farklı ay çekirdeği küspesi konsantrasyonlarında enzim üretiminin zamanla değişimi (K.H = 150 rpm, T=30°C, başlangıç pH'sı = 6.7, ay çekirdeği küspesi boyutu = 0.15 mm, ay çekirdeği küspesi kons. (g/L) = ●:10, Δ:25, ▲:50, □:75, ■:100)



Şekil 7.25 Farklı ay çekirdeği küspesi konsantrasyonlarında ortam pH'sının zamanla değişimi (K.H = 150 rpm, T=30°C, başlangıç pH'sı = 6.7, ay çekirdeği küspesi boyutu = 0.15 mm, ay çekirdeği küspesi kons. (g/L) = ●:10, Δ:25, ▲:50)



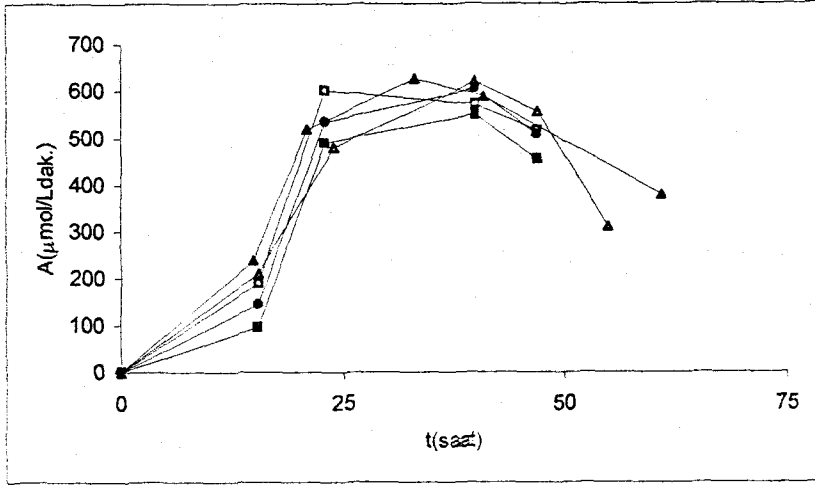
Şekil 7.26 Farklı ay çekirdeği küspesi konsantrasyonlarında maksimum enzim üretimi (K.H = 150 rpm, T=30°C, başlangıç pH'sı = 6.7, ay çekirdeği küspesi boyutu = 0.15 mm)

Şekil 7.26'da ise farklı konsantrasyonlardaki maksimum enzim aktiviteleri gösterilmektedir.

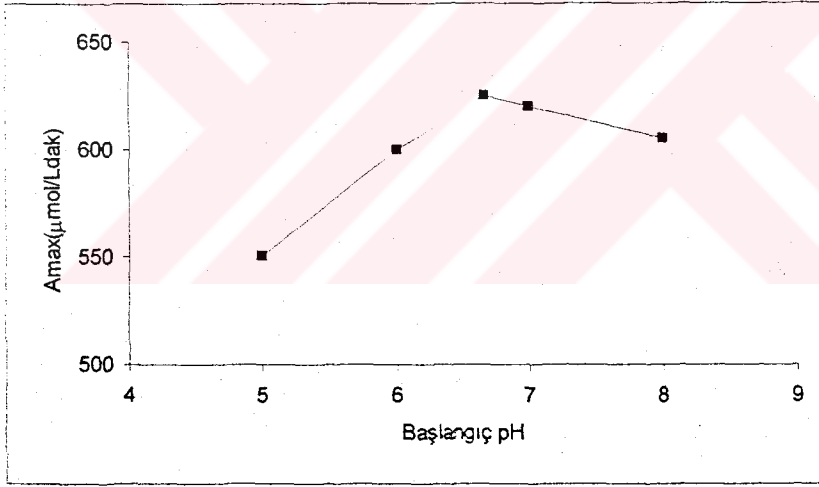
7.2.3. Farklı Başlangıç pH'sının Etkisi

Bütün fermentasyon sistemlerinde olduğu gibi kullanılan mikroorganizma, besi ortamının başlangıç şartlarından (karbon kaynağı cinsi ve miktarı, ortam pH'sı, karıştırma hızı v.b) ve çevre şartlarından etkilenecektir. Başlangıç pH'sı hem mikroorganizmanın gelişmesinde hem de enzim üretimi üzerinde etkili olan önemli bir parametredir. Ay çekirdeği küspesi için başlangıç pH'sının etkisini görmek amacıyla yapılan deneyler Şekil 7.27, 7.28 ve 7.29'da verilmektedir.

Şekil 7.27'de farklı başlangıç pH'larında lipaz aktivitesinin zamanla değişimi gösterilmiş olup şekilden de görüldüğü gibi ortamın doğal pH'sından (6.7) düşük pH'larda (5 ve 6) lipaz aktivitesi düşük, pH; 7 ve 8'de ise aktivite daha yüksektir. Şekil 7.28'de ise farklı başlangıç pH'larının maksimum enzim üretimi gösterilmektedir. Şekilden de görüldüğü gibi en yüksek aktivitenin başlangıç pH'sı 6.7'de olduğu belirgin olarak görülmektedir. Buradan, lipaz üretim mekanizmasının ortamın asidik olmasından olumsuz, nötr ve hafif bazik ortam şartlarından ise pek fazla etkilenmediği söylenebilir.



Şekil 7.27 Ay çekirdeği küspesi için farklı başlangıç pH'larında enzim üretiminin zamanla değişimi (K.H=150 rpm, T=30°C, ay çekirdeği küspesi boyutu = 0.15 mm, başlangıç pH'sı: ■:5, □:6, ▲:6.7, △:7, ●:8)

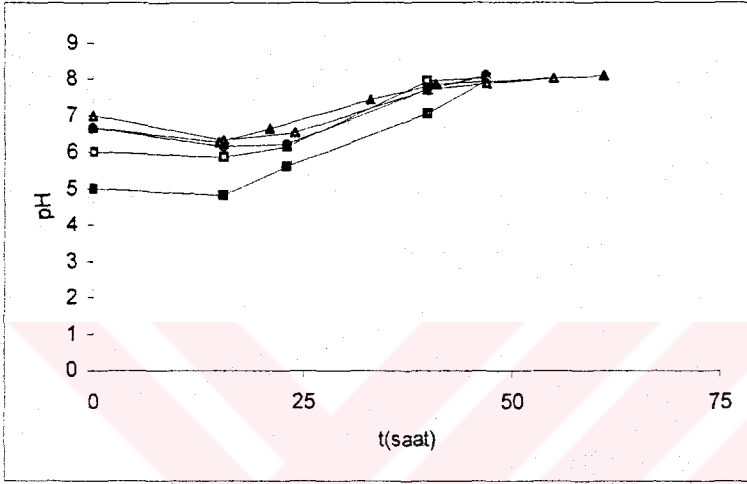


Şekil 7.28 Ay çekirdeği küspesi için farklı başlangıç pH'larında maksimum enzim üretimi (K.H=150 rpm, T=30°C, ay çekirdeği küspesi boyutu = 0.15 mm, ay çekirdeği küspesi kons. = 50 g/L)

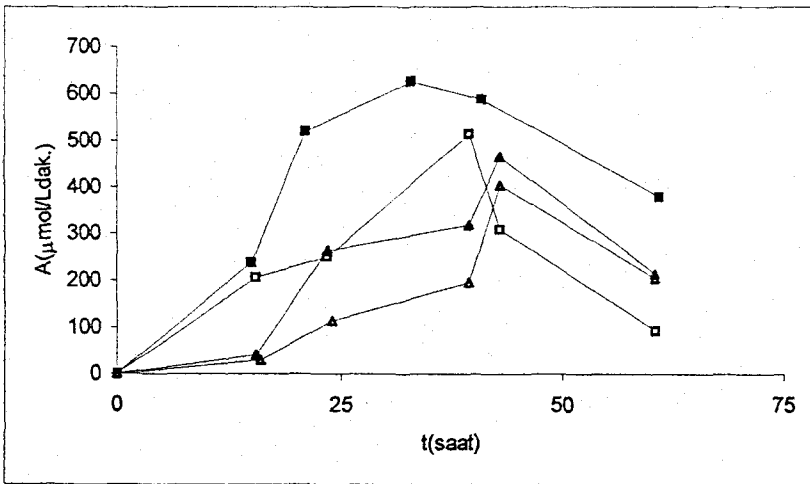
Şekil 7.29'da ay çekirdeği küspesi için farklı başlangıç pH'larında ortam pH'sının zamanla değişimi görülmektedir. Tüm başlangıç pH'larında, ortam pH'sın da önce bir düşme sonra bir yükselme görülmektedir.

7.2.4. Farklı Başlangıç Spor Konsantrasyonunun Etkisi

Spor konsantrasyonunun enzim üretimine etkisini görebilmek için spor konsantrasyonu 1/1, 1/10, 1/100 ve 1/1000 oranında seyreltili. Şekil 7.30'da farklı spor konsantrasyonlarında lipaz üretiminin zamanla değişimi gösterilmektedir. Şekilden de

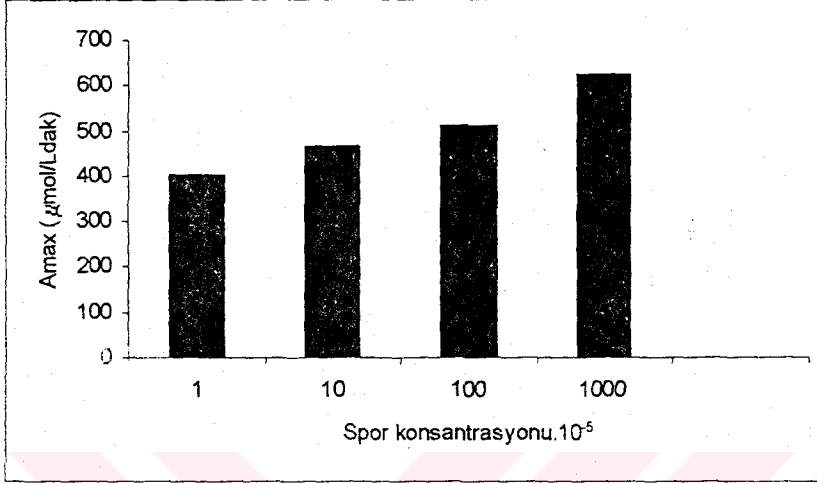


Şekil 7.29 Ay çekirdeği küspesi için farklı başlangıç pH'larında ortam pH'sının zamanla değişimi (K.H=150 rpm, T=30°C, ay çekirdeği küspesi boyutu = 0.15 mm, başlangıç pH'sı: ■:5, □:6, ▲:6.7, △:7, ●:8)

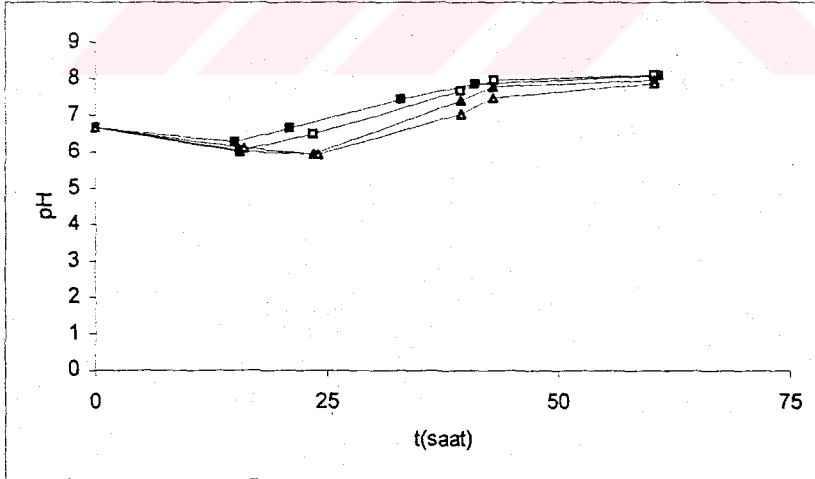


Şekil 7.30 Ay çekirdeği küspesi için farklı spor konsantrasyonlarında enzim üretiminin zamanla değişimi (K.H=150 rpm, T=30°C, başlangıç pH'sı=6.7, ay çekirdeği küspesi boyutu = 0.15 mm, ay çekirdeği küspesi kons.=50 g/L, spor kons. (spor/ml) = △:1.10⁵, ▲:1.10⁶, □:1.10⁷, ■:1.10⁸)

görüldüğü gibi spor konsantrasyonu azaldıkça aktivite düşmektedir. Şekil 7.31'de ise farklı spor konsantrasyonlarının maksimum enzim aktiviteleri gösterilmektedir. En yüksek aktivite 1.10^8 spor konsantrasyonunda elde edilmiştir.



Şekil 7.31 Ay çekirdeği küspesi için farklı spor konsantrasyonlarında maksimum enzim üretimi (K.H=150 rpm, T=30°C, başlangıç pH'sı=6.7, ay çekirdeği küspesi boyutu = 0.15 mm, ay çekirdeği küspesi kons.=50 g/L)

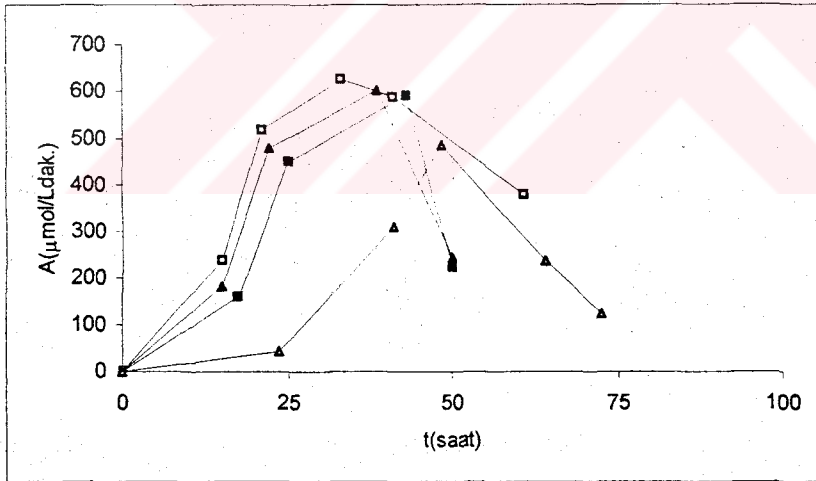


Şekil 7.32 Ay çekirdeği küspesi için farklı spor konsantrasyonlarında ortam pH'sının zamanla değişimi (K.H=150 rpm, T=30°C, başlangıç pH'sı=6.7, ay çekirdeği küspesi boyutu = 0.15 mm, ay çekirdeği küspesi kons.=50 g/L, spor kons. (spor/ml) = Δ : 1.10^5 , $\blacktriangle$: 1.10^6 , $\square$: 1.10^7 , $\blacksquare$: 1.10^8)

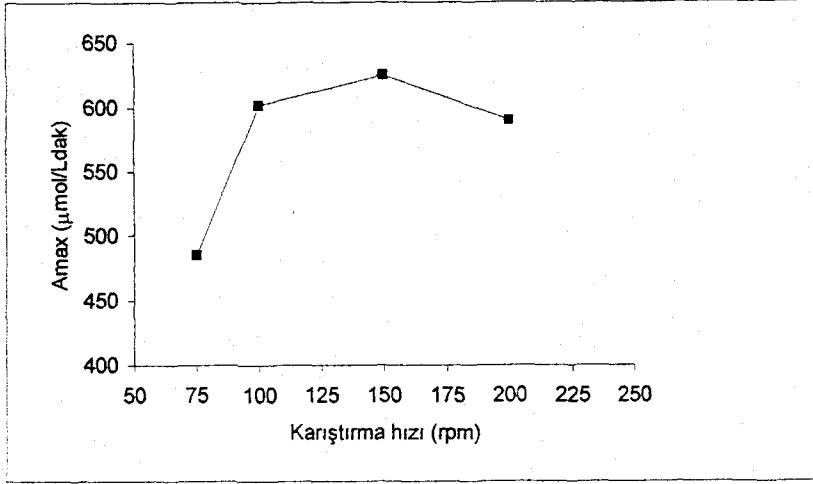
Şekil 7.32’de ise farklı spor konsantrasyonlarında ortam pH’sının zamanla değişimi görülmektedir.

7.2.5. Karıştırma Hızının Enzim Üretimine Etkisi

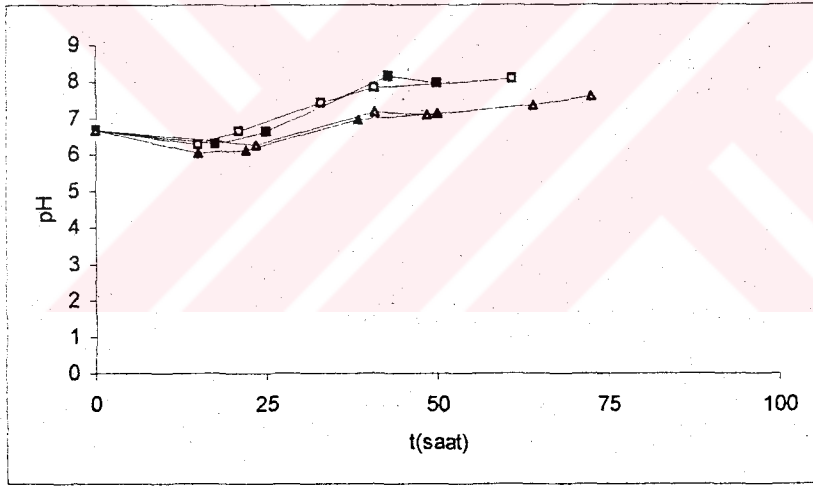
Fermantasyonda mikroorganizmanın metabolik davranışını etkileyecek önemli parametrelerden biri de karıştırma hızıdır. Karıştırma hızının lipaz enzimi üretimine etkisi Şekil 7.33 ve 7.34’de verilmektedir. 75, 100, 150 ve 200 rpm gibi dört farklı karıştırma hızında yapılan deneylerde, düşük karıştırma hızında ürün miktarının az oluşu, aerobik ortamın yeterli oranda olmadığını göstermektedir. Mikroorganizmanın faaliyetlerini sürdürmesi için gerekli olan oksijenin sağlanamadığı söylenebilir. Yüksek karıştırma hızı ise, mikroorganizmanın morfolojik yapısını olumsuz yönde etkilediğinden bu durum için mikroorganizmanın yüksek karıştırma hızında gelişimini tam olarak tamamlayamadığı söylenebilir. 150 rpm karıştırma hızında ise, lipaz enzimi üretimi için optimum şartlar sağlanmaktadır.



Şekil 7.33 Ay çekirdeği küspesi için farklı karıştırma hızlarında enzim miktarının zamanla değişimi (T=30°C, başlangıç pH'sı = 6.7, ay çekirdeği küspesi boyutu = 0.15 mm, ay çekirdeği küspesi kons.=50 g/L, karıştırma hızı (rpm) = Δ:75, ▲:100, □:150, ■:200)

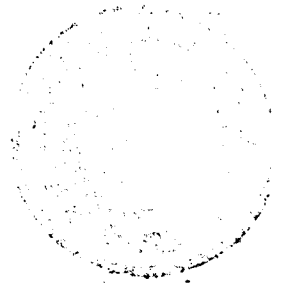


Şekil 7.34 Ay çekirdeği küspesi için farklı karıştırma hızlarında maksimum enzim aktiviteleri ($T=30^{\circ}\text{C}$, başlangıç pH'sı = 6.7, ay çekirdeği küspesi boyutu = 0.15 mm, ay çekirdeği küspesi kons.=50 g/L)



Şekil 7.35 Ay çekirdeği küspesi için farklı karıştırma hızlarında ortam pH'sının zamanla değişimi ($T=30^{\circ}\text{C}$, başlangıç pH'sı = 6.7, ay çekirdeği küspesi boyutu = 0.15 mm, ay çekirdeği küspesi kons.=50 g/L, karıştırma hızı (rpm) = Δ :75, $\blacktriangle$:100, $\square$:150, $\blacksquare$:200)

Farklı karıştırma hızlarında ortam pH'sının zamanla değişimi Şekil 7.35'de gösterilmektedir.

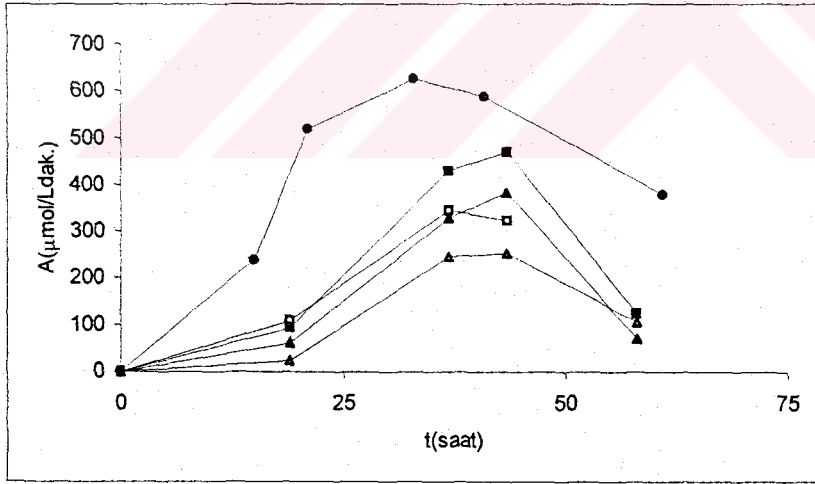


7.2.6 Ay Çekirdeği Küspesi Ortamına Katkı Maddeleri İlavesi

K.H.F ile elde edilecek ürün miktarını etkileyen önemli parametrelerden biride ortama eklenen katkı maddeleridir. Bu çalışmada glikoz, yeast ekstrakt, K_2HPO_4 ve KH_2PO_4 ve $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ katkı maddesi olarak kullanıldı.

7.2.6.1 Glikoz İlavesinin Etkisi

Glikoz ilavesinin etkisini görebilmek için dört farklı glikoz konsantrasyonu (0.25, 0.5, 1 ve 2 g/L) kullanıldı. Bu durum Şekil 7.36'da gösterilmektedir. Karbon kaynağı olarak kullanılan glikoz, bir çok fermentasyonda olduğu gibi represyon etkisi yapmıştır.



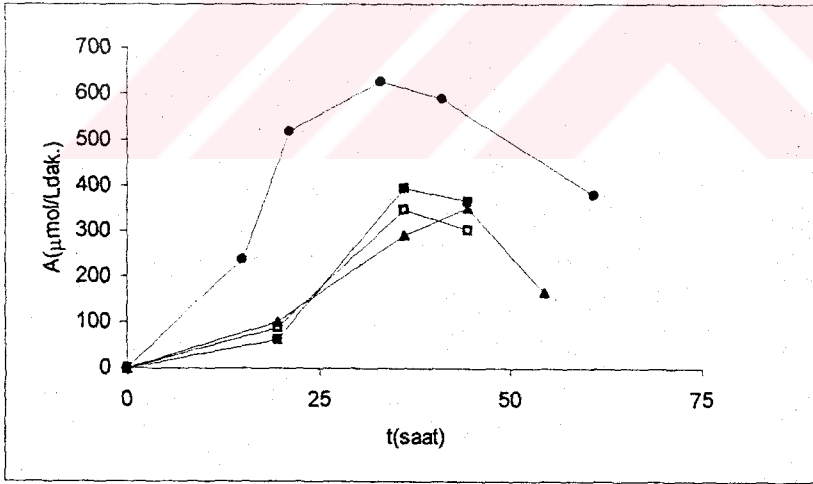
Şekil 7.36 Farklı glikoz konsantrasyonlarında enzim üretiminin zamanla değişimi (K.H = 150 rpm, T=30°C, başlangıç pH'sı = 6.7, ay çekirdeği küspesi boyutu = 0.15 mm, ay çekirdeği küspesi kons.=50 g/L, glikoz kons. (g/L) = ●:kontrol, ■:0.25, □:0.5, ▲:1, △:2)

7.2.6.2 Yeast Ekstrakt İlavesinin Etkisi

Azot kaynağı olarak kullanılan yeast ekstrakt ilavesinin etkisini görebilmek için yeast ekstrakt'ın 1, 2 ve 4 g/L konsantrasyonları kullanıldı ve sonuçlar Şekil 7.37'de gösterilmektedir. Şekilden de görüldüğü gibi yeast ekstrakt, ortamın karbon-azot dengesini bozarak represyon etkisi göstermiştir.

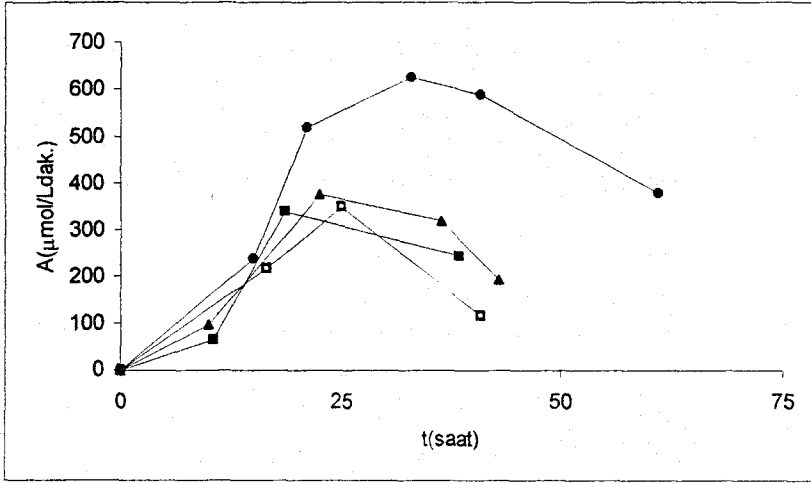
7.2.6.3 K_2HPO_4 ve KH_2PO_4 İlavesinin Etkisi

Bu çalışmada 0.25, 0.5 ve 1 g/L konsantrasyonlarında K_2HPO_4 ve KH_2PO_4 kullanıldı. Deneylerden elde edilen sonuçlar Şekil 7.38'de verilmektedir. Şekilden de açık bir şekilde görüleceği gibi ortama ilave edilen K_2HPO_4 ve KH_2PO_4 enzim üretimi üzerine olumsuz bir etki göstermiştir.

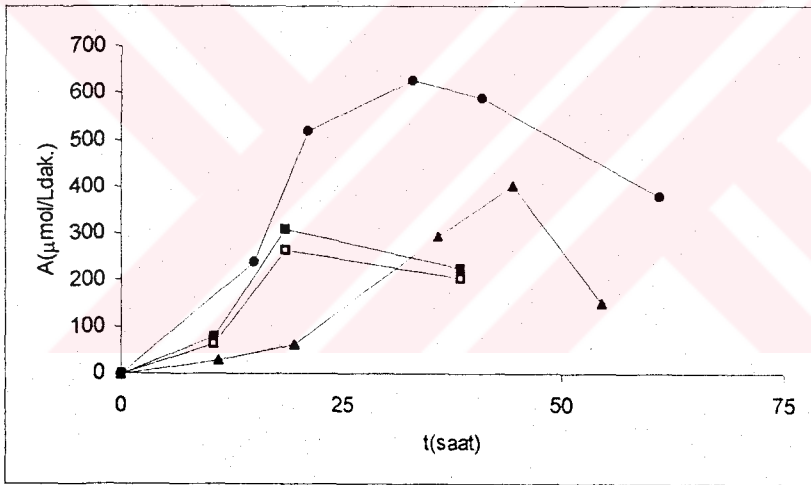


Şekil 7.37 Farklı yeast ekstrakt konsantrasyonlarında enzim üretiminin zamanla değişimi (K.H = 150 rpm, T=30°C, başlangıç pH'sı = 6.7, ay çekirdeği küspesi boyutu = 0.15 mm, ay çekirdeği küspesi kons.=50 g/L, yeast ekstrakt kons. (g/L) = ●:kontrol, ■:1, □:2, ▲:4)





Şekil 7.38 Farklı K_2HPO_4 ve KH_2PO_4 konsantrasyonlarında enzim üretiminin zamanla değişimi (K.H = 150 rpm, $T=30^\circ C$, başlangıç pH'sı = 6.67, ay çekirdeği küspesi boyutu = 0.15 mm, ay çekirdeği küspesi kons.=50 g/L, K_2HPO_4 ve KH_2PO_4 kons. (g/L) = ●:kontrol, ■:0.25, □:0.5, ▲:1)



Şekil 7.39 Farklı $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ konsantrasyonlarında enzim üretiminin zamanla değişimi (K.H = 150 rpm, $T=30^\circ C$, başlangıç pH'sı = 6.67, ay çekirdeği küspesi boyutu = 0.15 mm, ay çekirdeği küspesi kons.=50 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ kons. (g/L) = ●:kontrol, ■:0.1, □:0.2, ▲:0.4)

7.2.6.4 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ İlavesinin Etkisi

Bu çalışmada 0.1, 0.2 ve 0.4 g/L konsantrasyonlarında $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ kullanılarak yapılan deneylerden elde edilen sonuçlar Şekil 7.39'da verilmektedir. Şekilden de görüldüğü gibi katkısız ortamdaki aktivite daha yüksektir. Aynı şekilde burada da ortama katılan $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ enzim üretiminde represyon etkisi yapmıştır.



7.3. Genel Sonular

■ Katı hal fermantasyonunda karbon kaynağı olarak buğday kepeğı kullanıldığında en yüksek aktivite 0.3 mm kepek boyutu ve %5 kepek konsantrasyonunda elde edilmiştir.

■ Buğday kepeğinden lipaz üretiminde 5, 6, 6.7, 7 ve 8 başlangı pH'larından en yüksek enzim aktivitesi ortamın kendi doğal pH'sı olan 6.7'de elde edilmiştir.

■ Buğday kepeğı ortamında 1.10^8 , 1.10^7 , 1.10^6 ve 1.10^5 spor/ml başlangı spor konsantrasyonlarının lipaz üretimi üzerine etkisinin incelendiğı deneylerde, en yüksek aktivite 1.10^8 spor konsantrasyonunda elde edilmiştir.

■ Buğday kepeğı ortamında 75, 100, 150 ve 200 rpm gibi 4 farklı karıştırma hızının lipaz üretimine etkisi incelendiğinde en yüksek aktivite 150 rpm değerinde elde edildi.

■ Buğday kepeğı ortamına indükleyici olarak mısır özü yağının 0.5, 1 ve 10 g/L konsantrasyonları kullanıldığında en yüksek aktivite 1 g/L mısır özü yağı konsantrasyonunda 955.563 $\mu\text{mol/L.dak}$ olarak bulunmuştur.

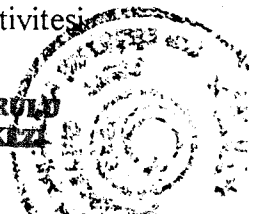
■ Buğday kepeğı ortamına glikoz, yeast ekstrakt, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 ve KH_2PO_4 eklendiğinde aktivite üzerine olumsuz etki yaptığı görölmüştür.

■ Karbon kaynağı olarak ay ekirdeğı küspesi kullanıldığında en yüksek aktivite 0.15 mm ay ekirdeğı küspesi boyutu, %5 ay ekirdeğı küspesi konsantrasyonu ve ortamın pH'sı olan 6.7'de elde edilmiştir.

■ Ay ekirdeğı küspesi ortamında en yüksek aktivite 1.10^8 spor/ml spor konsantrasyonu ve 150 rpm karıştırma hızında elde edilmiştir.

■ Ay ekirdeğı küspesi ortamına glikoz, yeast ekstrakt, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 ve KH_2PO_4 ilavesinde aktivitenin katkısız ortama göre daha düşük olduğı gözlenmiştir.

■ Katı hal fermantasyonunda buğday kepeğı ve ay ekirdeğı küspesini kendi aralarında aktiviteleri bakımından karşılaştıracak olursak buğday kepeğinin aktivitesi



(751.9 $\mu\text{mol/L.dak}$) ay çekirdeği küspesinin aktivitesine (625.175 $\mu\text{mol/L.dak}$) göre daha yüksek olduğu görülmüştür.

- Ay çekirdeği küspesinde maksimum aktiviteye ($625.175 \mu\text{mol/L.dak}$) buğday kepeğinden ($751.9 \mu\text{mol/L.dak}$) daha kısa zamanda ulaşılmıştır.

KAYNAKLAR

- Abderhaclden, E., Geidel, W., 1932, "Ferment for Schung" 13, 156.
- Aidoo, K.E., Hendry, R. and Wood, B.J.B., 1982, "Solid Substrate Fermentations", Advance in Microbiology, 28, 201-237.
- Aktan, F., 1981, "Biyoloji", Çukurova Ün. Yayınları, No: 5, 564-584.
- Amman, R., Bartseht, K., 1934, Biochem., 268, 831.
- Andreas, K., Annette, L., Leda, R., Denise, M.G., 1999, "Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate", Process Biochemistry, 35, 85-90.
- Bailey, J.E. and Ollis, D.F., 1977, "Biocemical Engineering Fundamentals", 371-376, 232-241, 525-545, McGraw Hill Co., London.
- Bayer, J., Pedit, J.L., Guidicelli, H., 1930, BBA, 210, 411.
- Benzonana, G., 1968, "Biochem. Biophs. Acta., 151, 137.
- Benzonana, G., 1969, "Biochem. Biophs. Acta., 176, 839.
- Besson, I., Creuly, C., Gros, J.B., Larroche, C., 1997, "Pyrazine production by *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation on soybeans", Appl. Microbiol. Biotechnol., 47, 489-495.
- Bhushan, B., Dosanjh, N.S., Kumar, K. And Hoondal, G.S., 1994, "Lipase Production From An Alkalophilic Yeast sp. By Solid State Fermentation", Biotechnology Letters, Vol.16, No:8, 841-842.
- Bier, M., Nord, F.F., 1951, Arch. Biochem. And Biops., 31, 335.
- Brocherhoff, H. F., 1979, " Biochim. Biophs. Acta" 92, 212.
- Cordova, J. , Nemmaoui, M., Ismayli-Alaoui, M., Morin, A., Roussos, S., 1998, " Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse", Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 5, 75-78.
- Desnuelle, P., 1972, " Pancreatic Lipase" Adv. In Enzymol., 23, 129.
- Dixon, M., Webb, C.E., 1967, "Enzymes", Longman S. Green and Co. Ltd., London.
- Gacesa, P., Hubble, J., 1992, " Enzyme Technology" Open University Press, Milton, Keynes, UK.



Gad, I., 1949, Dacnsk Tidsskr. Farm., 23, 1.

Gürsoy, G., 1991, "Lactic Acid Production By Immobilized *Rhizopus oryzae*", Yüksek Lis. Tezi, ODTÜ Fen Bil. Enst., Ankara.

Hang, Y.D., 1989, "Direct Fermentation of Corn to L(+)-Lactic Acid By *Rhizopus oryzae*", Biotechnology Letters, 11,4, 299-300.

Kamini, N.R., Mala, J.G.S. and Puvanakrishnan, R., 1998, "Lipase Production From *Aspergillus niger* By Solid State Fermentation Using Gingelly Oil Cake", Process Biochem., Vol.33, No:5, 505-511.

Köşker, Ö., 1980, "Genel Mikrobiyoloji", 214-242, Ankara.

Lacgerlöf, H.O, 1947, Acta Physiol. Scand., 13, 301.

Lacgerlöf, H.O, Scand, J., 1962, Clin. Lab. Invest., 14, 94.

Marchis-Mauren, G., Sarda, L., Desnuelle, P., 1959, "Arch. Biochem. Biophys.", 83, 309.

Meito-Sangyo, 1979, "Technical Bulletin Service" No:1, Tokyo.

Munoz, G., Valecia, J.R., Sachez, S. and Farres, A., 1991, "Production of microbial lipases in a solid state fermentation system", Biotechnology Letters, Vol.13, No: 4, 277-280, Mexico.

Nevgi, G.V., Ramakrishnan, C.V., 1958, J. Indian Chem. Sec., 27, 334.

Özhan, M., 1971, Atatürk Üniversitesi Yayınları, No:130.

Pamir, H.M., 1978, Teknik ve Endüstriyel Mikrobiyoloji, 61-68, Ankara.

Pekin, B., 1980, "Biyokimya Mühendisliği (Temel İlkeler)", E.Ü.Kimya Fak. Yayınları, No. 3, İzmir.

Reddy, P.R.M., Reddy, G., Seenayya G., 1999, "Production of thermostable b-amylase and pullulanase by *Clostridium thermosulfurogenes* SV2 in solid-state fermentation Screening of nutrients using Plackett-Burman design", Bioprocess Engineering, Vol. 21, 175-179.

Roberts, D.V., 1977, "Enzyme Kinetics", Cambridge Univ. Press, London.

Ruggieri, G., Bellias, P., Smilari, L., 1955, "Boll. Soc. Med. Chir. Catania", 23, 141.

Samerra, M., Dufou, C., 1972, Biochemica Biophysica Acta, 260, 393.

Sarda, L. and Desneulle, P., 1958, "Action de la Lipase Pancreatique Sur les Esters en Emulsion" Biochim. Biophys., 30, 315-521.

Schonheyder, F., Wolovartz, K., 1948, "Acta Physiologica Scandinavica" 9, 57.

Sekar, C., Balaraman, K., 1998, "Optimization studies on the production of cyclosporin A by solid state fermentation", Bioprocess Engineering, Vol 18, 293-296.

Segel, I.H., 1975, "Behaviour and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady State Enzyme Systems", Wiley-Interscience Publication, New York.

Smits, J.P., Rinzema, A., Tramper, J., 1996, "Solid State Fermentation of Wheat Bran by *Trichoderma Reesei* QM9414; Substrate Composition Changes, C Balance, Enzyme Production, Growth and Kinetics", Appl. Microbial Biotechnol., 46, 489-496.

Smythe, C.V. and Drake, B.B., 1949, "Fungal Lipase", U.S. Patent.

Soccol, C.R., Marin, B., Lebeault, J.-M., Raimbault, M., 1994, "Potential of solid state fermentation for production of L(+)-lactic acid by *Rhizopus oryzae*", Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 41, 3, 286-290.

Souza, M. C., Roberto, I. C., Milagres, A. M. F., 1999, "Solid-state fermentation for xylanase production by *Thermoascus aurantiacus* using response surface methodology", Appl. Microbiol. Biotechnol., 52, 768-772.

Tao, S., Zuohu, L., Deming, L., 1996, "A Novel Design of Solid State Fermenter and Its Evaluation for Cellulase Production by *Trichoderma viride* SL-1", Vol. 10, No:11, 889-894.

Tunga, R., Banerjee R., Bhattacharyya, B.C., 1998, "Optimizing some factors affecting protease production under solid state fermentation", Bioprocess Engineering, Vol 19, 187-190.

Uçar, T., Ekiz, H. İ., Çelebi, S., Çağlar, A., 1987, "The Effect of Solvent on the Kinetics of Free and Immobilized Lipase" Biocatalysis in Organic Media, (C. Loane, J. Tramper and M. D. Lilly, ed.)

Ul-Haq, I., Idrees, S., Rajoka, M. I., 2002, "Production of lipases by *Rhizopus oligosporous* by solid-state fermentation", Process Biochemistry, 37, 637-641.

Ünsaçar, M., 1998, "Serbest ve Tutuklanmış *Rhizopus Arrhizus*' dan Lipaz Üretimi", Yüksek Lis. tezi, F.Ü. Fen Bil. Enst., Elazığ.

Verger, R., Haas, G., 1976, "Ann. Rev. Biophys Bioeng." 5, 77.

Wills, E. D., 1961, "The Enzymes in Lipid Metabolism", 13, McMillan (Pergamon), New York.

Wills, E. D., 1965, "Lipases", Adv. Lipid Res., Vol. 3, Academic Press, New York, 197.

Zhu, Y., Smits, J.P., Knol, W., Bol, J., 1994, "A Novel Solid State Fermentation System Using Polyurethane Foam as Inert Carrier", Nutrition and Food Research, Vol. 16, No:61, 643-648.



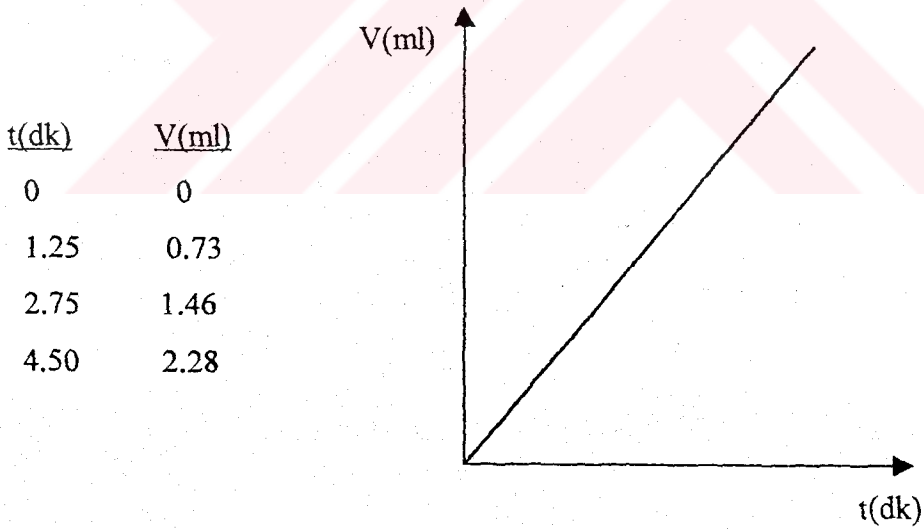
9. EKLER

Ek 1

Başlangıç Tepkime Hızlarının Saptanması:

Başlangıç tepkime hızı tepkime başladıktan sonra kısa süre için ulaşılan maksimum hız olarak tanımlanır. Bu sistemde pH-stat metodu kullanılmıştır. Hidroliz tepkimesini izlemekte kullanılan sistemde, hidroliz sonucu oluşan yağ asidini nötrleştirerek ortam pH'sını sabit bir değerde tutmak için tepkime ortamına kısa aralıklarla NaOH ilave edilmektedir. Zamana karşı ilave edilen NaOH lineer regrasyon programıyla eğimi bulunur. Eğim (dV/dt)'dir. Bulunan eğim, ilave edilen NaOH konsantrasyonuyla çarpılıp (0.01N), tepkime kabı hacmine bölünürse (30 ml) başlangıç tepkime hızı $\mu\text{mol/L.dk}$ biriminde bulunur. Başlangıç tepkime hızını bulmak için bir örnek aşağıda verilmiştir.

ÖRNEK :



$$\text{Eğim} = 0.503$$

$$A = (0.503 \text{ ml/dk})(0.01 \text{ mol/L})(1.10^6 \mu\text{mol/mol}) / (30 \text{ ml})$$

$$A = 167.6 \mu\text{mol/L.dk}$$

Ek 2**Buğday Kepeğinin Bileşimi**

Nem:	% 8
Kuru madde:	% 92
Ham protein:	% 15.5
Ham selüloz:	% 11.16
Yağ:	% 5.13
Kül:	% 4.79
Organik maddeler:	% 87.17
Nemsiz ekstrakt maddeleri:	% 55.39

Eser elementler:

Ca :	% 0.17
P :	% 1.2
Mg :	% 0.5
Na :	% 0.07
K :	% 0.8
Cl :	% 0.08



Ek 3**Ay Çekirdeği Küspesinin Bileşimi**

Nem:	% 11
Ham protein:	% 30
Ham selüloz:	% 27
Ham Yağ:	% 3
Kül:	% 9
Diğerleri:	% 20



Ek 4

Deneysel veriler:

Tablo E1. Farklı kepek boyutlarında enzim üretiminin zamanla değişimi. (Şekil 7.1.)

0.15 kepek		0.3 kepek		0.6 kepek		1.18 kepek		2.36 kepek	
Zaman (saat)	Aktivite ($\mu\text{mol/Ldk}$)	Zaman (saat)	Aktivite ($\mu\text{mol/Ldk}$)	Zaman (saat)	Aktivite ($\mu\text{mol/Ldk}$)	Zaman (saat)	Aktivite ($\mu\text{mol/Ldk}$)	Zaman (saat)	Aktivite ($\mu\text{mol/Ldk}$)
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	136.692	24	109.746	25	62	25	35	25	45.62
39	62	48	147.26	37.5	122	36	194.6	34.5	104
48.5	78	60.5	193.63	49	182	48	336.507	45.5	182.25
86.5	119	70.5	218.01	72	332.25	69	409.615	70	250
95.5	159.306	88.5	309.72	85	492	78	353.754	79	290.112
112	162.25	99.5	643.77	96	221	93	138.88	92	310.254
122	149.951	112	751.9	108.5	133.33	107	69.87	103	285.03
186	67.276	121.5	577.82	120	96.54	-	-	116.5	214.503

Tablo E2. Farklı kepek boyutlarında ortam pH'sının zamanla değişimi. (Şekil 7.2.)

0.15 kepek		0.3 kepek		0.6 kepek		1.18 kepek		2.36 kepek	
Zaman (saat)	pH	Zaman (saat)	pH	Zaman (saat)	pH	Zaman (saat)	pH	Zaman (saat)	pH
0	6.67	0	6.67	0	6.67	0	6.67	0	6.67
24	3.11	24	3.2	25	6.38	25	6.5	25	4.58
39	3	48	3.3	37.5	3.73	36	3.53	34.5	3.52
48.5	3.1	60.5	3.47	49	3.87	48	3.89	45.5	3.68
86.5	4.66	70.5	3.54	72	6.27	69	6.43	70	5.1
95.5	5.06	88.5	3.75	85	7.28	78	7.08	79	6.56
112	7.21	99.5	4.17	96	7.53	93	7.5	92	6.56
122	7.54	112	6.08	108.5	7.85	107	8.14	103	7.36
186	7.72	121.5	5.11	120	7.83	-	-	116.5	7.58

Tablo E3. Farklı kepek boyutlarındaki maksimum enzim üretimi. (Şekil 7.3.)

Boyut (mm)	Amax ($\mu\text{mol/Ldk}$)
0.15	162.25
0.3	751.9
0.6	492
1.18	409.615
2.36	310.254

Tablo E4. Farklı kepek konsantrasyonlarında enzim üretiminin zamanla değişimi. (Şekil 7.4.)

10 g/L		25 g/L		50 g/L		75 g/L		100 g/L	
Zaman (saat)	Aktivite ($\mu\text{mol/Ldk}$)	Zaman (saat)	Aktivite ($\mu\text{mol/Ldk}$)	Zaman (saat)	Aktivite ($\mu\text{mol/Ldk}$)	Zaman (saat)	Aktivite ($\mu\text{mol/Ldk}$)	Zaman (saat)	Aktivite ($\mu\text{mol/Ldk}$)
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	68.716	24.5	95.862	24	109.746	23	136.525	24	102.165
50	197.996	40.5	57.561	48	147.26	47	24.896	38	138.56
65	174.34	49.5	105.1366	60.5	193.63	85.5	128.0952	48	157.857
74	112.2593	74.5	146.851	70.5	218.01	93	216.952	62	168.256
89	143.0468	89.5	322.935	88.5	309.72	108	545.523	87	169.107
97.5	57.823	97	205.589	99.5	643.77	132	721.35	97.5	228.75
114.5	30.829	113.5	53.7978	112	751.9	156	270.135	112	323.594
-	-	122	43.602	121.5	577.82	-	-	136	711.826
-	-	-	-	-	-	-	-	158	201.962

Tablo E5. Farklı kepek konsantrasyonlarında ortam pH'nın zamanla değişimi. (Şekil 7.5)

10 g/L		25 g/L		50 g/L		75 g/L		100 g/L	
Zaman (saat)	pH	Zaman (saat)	pH	Zaman (saat)	pH	Zaman (saat)	pH	Zaman (saat)	pH
0	6.67	0	6.67	0	6.67	0	6.67	0	6.67
25	4.99	24.5	3.23	24	3.2	23	3.33	24	3.86
50	4.21	40.5	3.78	48	3.3	47	3.35	38	3.81
65	6.91	49.5	3.8	60.5	3.47	85.5	3.72	48	3.91
74	6.76	74.5	3.88	70.5	3.54	93	3.74	62	4.16
89	6.97	89.5	6.08	88.5	3.75	108	5.48	87	4.12
97.5	7.28	97	6.86	99.5	4.17	132	7	97.5	4.9
114.5	7.55	113.5	7.32	112	6.08	156	7.62	112	5.4
-	-	122	7.43	121.5	5.11	-	-	136	6.69
-	-	-	-	-	-	-	-	158	7.33

Tablo E6. Farklı kepek konsantrasyonlarında maksimum aktivite değerleri. (Şekil 7.6.)

Kons. (%)	Amax ($\mu\text{mol/Ldk}$)
1	143.0468
2.5	322.935
5	751.9
7.5	721.35
10	711.826

Tablo E7. Kepek için farklı başlangıç pH değerlerinde enzim üretiminin zamanla değişimi. (Şekil 7.7)

pH 5		pH 6		pH 6.7		pH 7		pH 8	
Zaman (saat)	Aktivite ($\mu\text{mol/Ldk}$)	Zaman (saat)	Aktivite ($\mu\text{mol/Ldk}$)	Zaman (saat)	Aktivite ($\mu\text{mol/Ldk}$)	Zaman (saat)	Aktivite ($\mu\text{mol/Ldk}$)	Zaman (saat)	Aktivite ($\mu\text{mol/Ldk}$)
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	27.447	22.5	63.368	24	109.746	23	92.445	25	120.922
40	200.419	39.5	154.759	48	147.26	39	295.206	38	210
47.5	231.228	47	250.822	60.5	193.63	46.5	253.918	45	302
63.5	202.284	63	310.76	70.5	218.01	62.5	334.545	62	457.456
73	305.48	72.5	465	88.5	309.72	72.5	347.332	84	413.388
88	439.0874	87.5	598.108	99.5	643.77	88	642.636	-	-
94.5	243.12	95	249	112	751.9	95	285	-	-
-	-	-	-	121.5	577.82	-	-	-	-

Tablo E8. Kepek için farklı başlangıç pH'larında ortam pH'sının zamanla değişimi. (Şekil 7.8.)

pH 5		pH 6		pH 6.7		pH 7		pH 8	
Zaman (saat)	pH	Zaman (saat)	pH	Zaman (saat)	pH	Zaman (saat)	pH	Zaman (saat)	pH
0	5	0	6	0	6.67	0	7	0	8
23	4.21	22.5	5.33	24	3.2	23	3.93	25	5.66
40	3.8	39.5	4.53	48	3.3	39	4.3	38	4.15
47.5	4.71	47	5.28	60.5	3.47	46.5	4.6	45	5.1
63.5	5.02	63	5.69	70.5	3.54	62.5	5.12	62	6.5
73	5.71	72.5	6.52	88.5	3.75	72.5	6.03	84	7.32
88	6.74	87.5	7.45	99.5	4.17	88	7.29	-	-
94.5	7.55	95	7.41	112	6.08	95	7.38	-	-
-	-	-	-	121.5	5.11	-	-	-	-

Tablo E9. Kepek için farklı başlangıç pH'larında maksimum enzim üretimi . (Şekil 7.9.)

Başlangıç pH	Amax ($\mu\text{mol/Ldk}$)
5	439.0874
6	598.108
6.67	751.9
7	642.636
8	457.436

Tablo E10. Kepek için farklı spor kons. enzim miktarının zamanla değişimi. (Şekil 7.10.)

1.10^8		1.10^7		1.10^6		1.10^5	
Zaman (saat)	Aktivite ($\mu\text{mol/Ldk}$)	Zaman (saat)	Aktivite ($\mu\text{mol/Ldk}$)	Zaman (saat)	Aktivite ($\mu\text{mol/Ldk}$)	Zaman (saat)	Aktivite ($\mu\text{mol/Ldk}$)
0	0	0	0	0	0	0	0
24	109.746	23	75.97	23.5	68.13	23.5	62.867
48	147.26	41	108	41.5	56.784	41.5	51.0426
60.5	193.63	49	180	49	37.114	49.5	50.05
70.5	218.01	68	200	68.5	108.455	69	285.934
88.5	309.72	88	280	88	203	88.5	370.312
99.5	643.77	98	615	98.5	590	99	497.568
112	751.9	120	500	120	385	120	354.123
121.5	577.82	-	-	-	-	-	-

Tablo E11. Kepek için farklı spor kons.'larında maksimum enzim üretimi. (Şekil 7.11.)

Başlangıç Spor kons.	Amax ($\mu\text{mol/Ldk}$)
1	497.568
10	590
100	615
1000	751.9

Tablo E12 Kepek için Farklı spor kons. ortam pH 'sının zamanla değişimi. . (Şekil 7.12.)

1.10^8		1.10^7		1.10^6		1.10^5	
Zaman (saat)	pH	Zaman (saat)	pH	Zaman (saat)	pH	Zaman (saat)	pH
0	6.67	0	6.67	0	6.67	0	6.67
24	3.2	23	4.33	23.5	4.22	23.5	3.96
48	3.3	41	4.19	41.5	3.6	41.5	3.52
60.5	3.47	49	4.81	49	3.59	49.5	3.56
70.5	3.54	68	5.13	68.5	4.05	69	4.04
88.5	3.75	88	6.41	88	5.38	88.5	6.44
99.5	4.17	98	7	98.5	6.51	99	7.25
112	6.08	120	7.1	120	7.54	120	7.89
121.5	5.11	-	-	-	-	-	-

Tablo E13. Kepek için farklı karıştırma hızlarında enzim miktarının zamanla değişimi. (Şekil 7.13.)

75		100		150		200	
Zaman (saat)	Aktivite ($\mu\text{mol/Ldk}$)	Zaman (saat)	Aktivite ($\mu\text{mol/Ldk}$)	Zaman (saat)	Aktivite ($\mu\text{mol/Ldk}$)	Zaman (saat)	Aktivite ($\mu\text{mol/Ldk}$)
0	0	0	0	0	0	0	0
24	77.09	16.5	107.0753	24	109.746	24	102.665
41	122.306	24	121.138	48	147.26	41	107.926
48	202.312	41	180.313	60.5	193.63	48	122.445
64	305.218	48	279.918	70.5	218.01	64	169.743
78	398.697	64	384.31	88.5	309.72	70	176.288
99	455.214	78	435.238	99.5	643.77	88	249.143
112	542.789	88	505.05	112	751.9	99	540.313
128	590.745	99	625.313	121.5	577.82	112	645.413
138	345.002	112	695.243	-	-	128	455.315
-	-	128	502.352	-	-	-	-

Tablo E14. Kepek için farklı karıştırma hızlarında ortam pH'sının zamanla değişimi. (Şekil 7.14.)

75 rpm		100 rpm		150 rpm		200 rpm	
Zaman (saat)	pH	Zaman (saat)	pH	Zaman (saat)	pH	Zaman (saat)	pH
0	6.67	0	6.67	0	6.67	0	6.67
24	3.36	16.5	3.41	24	3.2	24	3.36
41	3.19	24	3.71	48	3.3	41	3.55
48	3.76	41	3.96	60.5	3.47	48	3.68
64	3.7	48	4.6	70.5	3.54	64	4.52
78	4.31	64	4.89	88.5	3.75	70	5.54
99	5.87	78	5.22	99.5	4.17	88	5.7
112	6.7	88	5.79	112	6.08	99	6.46
128	7.03	99	6.42	121.5	5.11	112	6.8
138	7.76	112	7.13	-	-	128	7.65
-	-	128	7.43	-	-	-	6.67

Tablo E15. Kepek için farklı karıştırma hızlarının maksimum aktivite değerleri (Şekil 7.15.)

Karıştırma hızı (rpm)	Amax ($\mu\text{mol/Ldk}$)
75	590.745
100	695.243
150	751.9
200	645.413

Tablo E16. Farklı glikoz konsantrasyonlarında enzim miktarının zamanla değişimi. (Şekil 7.16.)

0 g/L glikoz		0.25 g/L glikoz		0.5 g/L glikoz		1 g/L glikoz		2 g/L glikoz	
Zaman (saat)	Aktivite (μmol/Ldk)	Zaman (saat)	Aktivite (μmol/Ldk)	Zaman (saat)	Aktivite (μmol/Ldk)	Zaman (saat)	Aktivite (μmol/Ldk)	Zaman (saat)	Aktivite (μmol/Ldk)
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	109.746	18.5	96.26	19	56.926	20	95.572	20	84.529
48	147.26	25	76.06	25.5	64.693	32	62.785	45.5	97.949
60.5	193.63	43	63.897	43.5	62.859	45.5	79.302	70	284.379
70.5	218.01	55	124.4756	69	175.161	70	262.644	92.5	383.987
88.5	309.72	69	165.754	93.5	348.0607	92.5	462.356	114.5	74
99.5	643.77	93.5	361.885	116	310.604	114.5	260.29	-	-
112	751.9	116	410.259	138	169.576	-	-	-	-
121.5	577.82	138	187.647	-	-	-	-	-	-

Tablo E17. Farklı yeast ekstrakt konsantrasyonlarında enzim miktarının zamanla değişimi.(Şekil 7.17.)

0 g/L Y.E		1 g/L Y.E		2 g/L Y.E		4 g/L Y.E	
Zaman (saat)	Aktivite (μmol/Ldk)	Zaman (saat)	Aktivite (μmol/Ldk)	Zaman (saat)	Aktivite (μmol/Ldk)	Zaman (saat)	Aktivite (μmol/Ldk)
0	0	0	0	0	0	0	0
24	109.746	20.5	121.315	21.5	55.769	20	155
48	147.26	38	41.993	43	109.1008	38	200
60.5	193.63	50.5	54.2559	50	166.1917	51	158.658
70.5	218.01	68	141.625	64.5	182.624	67.5	247.0666
88.5	309.72	87.5	166.585	71.5	192.435	87.5	77.414
99.5	643.77	97	352	87	102.261	-	-
112	751.9	112	56.01503	99.5	93.333	-	-
121.5	577.82	-	-	-	-	-	-

Tablo E18. Farklı mısırozü yağı konsantrasyonlarında enzim miktarının zamanla değişimi (Şekil 7.18.)

0 g/L mısırozü yağı		0.5 g/L mısırozü yağı		1 g/L mısırozü yağı		10 g/L mısırozü yağı	
Zaman (saat)	Aktivite (μmol/Ldk)	Zaman (saat)	Aktivite (μmol/Ldk)	Zaman (saat)	Aktivite (μmol/Ldk)	Zaman (saat)	Aktivite (μmol/Ldk)
0	0	0	0	0	0	0	0
24	109.746	26	156	26	137.935	22.5	150.6504
48	147.26	41	152.235	41	143.666	38	118.5308
60.5	193.63	67	423.286	67	440.816	47	145.325
70.5	218.01	89.5	878.355	89.5	955.563	64.5	413.809
88.5	309.72	116	762.356	116	812.122	87.5	673.0701
99.5	643.77	-	-	-	-	109.5	781.147
112	751.9	-	-	-	-	118	742.582
121.5	577.82	-	-	-	-	-	-



Tablo E19 Farklı K_2HPO_4 ve KH_2PO_4 konsantrasyonlarında enzim miktarının zamanla değişimi. (Şekil 7.19.)

0 g/L K_2HPO_4 KH_2PO_4		0.25 g/L K_2HPO_4 KH_2PO_4		0.5 g/L K_2HPO_4 KH_2PO_4		1 g/L K_2HPO_4 KH_2PO_4	
Zaman (saat)	Aktivite (μ mol/Ldk)	Zaman (saat)	Aktivite (μ mol/Ldk)	Zaman (saat)	Aktivite (μ mol/Ldk)	Zaman (saat)	Aktivite (μ mol/Ldk)
0	0	0	0	0	0	0	0
24	109.746	28	112.0325	24	182.319	24.5	101.577
48	147.26	41.5	158.08	40.5	184.403	40.5	116.648
60.5	193.63	52.5	197	51.5	246.979	49	132.149
70.5	218.01	65.5	235.736	67	317.474	66	256.911
88.5	309.72	74.5	364.734	92	391.135	72.5	342.542
99.5	643.77	93	353.583	100	338.0728	90	165.65
112	751.9	115.5	182.195	116	328.0582	97	122.012
121.5	577.82	120	143.983	139	165.1799	-	-

Tablo E20. Farklı $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ konsantrasyonlarında enzim üretiminin zamanla değişimi (Şekil 7.20)

0 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$		0.1 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$		0.2 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$		0.4 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	
Zaman (saat)	Aktivite	Zaman (saat)	Aktivite	Zaman (saat)	Aktivite	Zaman (saat)	Aktivite
0	0	0	0	0	0	0	0
24	109.746	24.5	123.0927	24	84.841	21	81.2598
48	147.26	40	112.714	38.5	60.6729	42.5	16.0341
60.5	193.63	49	123.178	48.5	70.3359	49.5	30.6649
70.5	218.01	65.5	127.914	65	172.639	64.5	58.774
88.5	309.72	72.5	209.023	88.5	187.857	86.5	259.926
99.5	643.77	97	310.39	113	298.576	100	241.349
112	751.9	113	361.692	119.5	207.764	117.5	47.489
121.5	577.82	119	441.0559	135.5	170.1004	-	-
-	-	142	314.632	-	-	-	-

Tablo E21. Farklı ay çekirdeği küspesi boyutlarında enzim üretiminin zamanla değişimi. (Şekil 7.21)

0.15 ay çekirdeği		0.3 ay çekirdeği		0.6 ay çekirdeği		1.18 ay çekirdeği		2.36 ay çekirdeği	
Zaman (saat)	Aktivite	Zaman (saat)	Aktivite	Zaman (saat)	Aktivite	Zaman (saat)	Aktivite	Zaman (saat)	Aktivite
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	237.886	15	286.528	15	237.201	10	50.979	10	31.803
21	518.726	21	425.981	21	529.132	16.5	183.154	16.5	155.691
33	625.175	33	580.13	33	480	24	384.662	24	400.362
41	587.702	41	465.909	41	350	36	480.186	36	430.569
61	379.046	61	196.73	61	213.561	42	314.197	42	355.546
-	-	-	-	-	-	59.5	214.227	59.5	272.33

Tablo E22. Farklı ay çekirdeği küspesi boyutlarında maksimum enzim üretimi (Şekil 7.22)

Boyut (mm)	Amax (μ mol/Ldk)
0.15	625.175
0.3	580.13
0.6	529.132
1.18	480.186
2.36	430.569

Tablo E23. Farklı ay çekirdeği küspesi boyutlarında ortam pH'sının zamanla değişimi. (Şekil 7.23)

0.15 ay çekirdeği		0.3 ay çekirdeği		0.6 ay çekirdeği		1.18 ay çekirdeği		2.36 ay çekirdeği	
Zaman (saat)	pH	Zaman (saat)	pH	Zaman (saat)	pH	Zaman (saat)	pH	Zaman (saat)	pH
0	6.67	0	6.67	0	6.67	0	6.67	0	6.67
15	6.27	15	6.22	15	6.25	10	6.13	10	5.64
21	6.66	21	6.8	21	6.8	16.5	6.21	16.5	6
33	7.43	33	7.55	33	7.61	24	6.59	24	6.45
41	7.85	41	7.81	41	8.1	36	7.74	36	7.47
61	8.08	61	8.14	61	8.26	42	7.93	42	7.79
-	-	-	-	-	-	59.5	8.53	59.5	7.93

Tablo E24. Farklı ay çekirdeği küspesi konsantrasyonlarında enzim üretiminin zamanla değişimi. (Şekil 7.24.)

10 g/L		25 g/L		50 g/L		75 g/L		100 g/L	
Zaman (saat)	Aktivite	Zaman (saat)	Aktivite	Zaman (saat)	Aktivite	Zaman (saat)	Aktivite	Zaman (saat)	Aktivite
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	99.0291	15	253.763	15	237.886	15	77.204	15	71.407
23.5	208.951	23.5	495.646	21	518.726	23.5	170	24.5	74.035
35	234.337	35	253.33	33	625.175	35	88	39	104
44.5	97.738	44.5	157.36	41	587.702	44.5	72.25	66.5	28.524
-	-	-	-	61	379.046	-	-	-	-

Tablo E25. Farklı ay çekirdeği küspesi konsantrasyonlarında ortam pH'sının zamanla değişimi. (Şekil 7.25.)

10 g/L		25 g/L		50 g/L	
Zaman (saat)	pH	Zaman (saat)	pH	Zaman (saat)	pH
0	6.67	0	6.67	0	6.67
15	6.68	15	6.37	15	6.27
23.5	7.53	23.5	7.71	21	6.66
35	7.99	35	8.31	33	7.43
44.5	8.43	44.5	8.23	41	7.85
-	-	-	-	61	8.08



Tablo E26. Farklı ay çekirdeği küspesi konsantrasyonlarında maksimum enzim üretimi (Şekil 7.26)

Kons. (g/L)	Amax (μ mol/Ldk)
1	234.337
2.5	495.646
5	625.175
7.5	170
10	104

Tablo E27. Ay çekirdeği küspesi için farklı başlangıç pH değerlerinde enzim üretiminin zamanla değişimi. (Şekil 7.27)

pH 5		pH 6		pH 6.7		pH 7		pH 8	
Zaman (saat)	Aktivite	Zaman (saat)	Aktivite	Zaman (saat)	Aktivite	Zaman (saat)	Aktivite	Zaman (saat)	Aktivite
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15.5	95.894	15.5	189.4308	15	237.886	15.5	210	15.5	144.935
23	489.528	23	599.878	21	518.726	24	480	23	535.155
40	550.354	40	571.324	33	625.175	40	620	40	605
47	454.786	47	515.535	41	587.702	47	556	47	508.292
-	-	-	-	61	379.046	55	310	-	-

Tablo E28. Ay çekirdeği küspesi için farklı başlangıç pH'larında maksimum enzim üretimi (Şekil 7.28).

Başlangıç pH	Amax (μ mol/Ldk)
5	550.354
6	599.878
6.67	625.175
7	620
8	605

Tablo E29. Ay çekirdeği küspesi için farklı başlangıç pH değerlerinde ortam pH'sının zamanla değişimi. (Şekil 7.29)

pH 5		pH 6		pH 6.7		pH 7		pH 8	
Zaman (saat)	pH	Zaman (saat)	pH	Zaman (saat)	pH	Zaman (saat)	pH	Zaman (saat)	pH
0	5	0	6	0	6.67	0	7	0	6.67
15.5	5.6	15.5	5.87	15	6.27	15.5	6.33	15.5	6.15
23	5.94	23	6.15	21	6.66	24	6.54	23	6.23
40	7.81	40	7.93	33	7.43	40	7.7	40	7.72
47	7.95	47	8.02	41	7.85	47	7.87	47	8.08
-	-	-	-	61	8.08	55	8	-	-



Tablo E30. Ay çekirdeği küspesi için farklı spor kons. enzim miktarının zamanla değişimi. (Şekil 7.30)

1.10 ⁵		1.10 ⁶		1.10 ⁷		1.10 ⁸	
Zaman (saat)	Aktivite	Zaman (saat)	Aktivite	Zaman (saat)	Aktivite	Zaman (saat)	Aktivite
0	0	0	0	0	0	0	0
16	29.94	15.5	40	15.5	206.3	15	237.886
24	113.13	23.5	264.238	23.5	250.427	21	518.726
39.5	196.446	39.5	318.33	39.5	513	33	625.175
43	404.601	43	465.43	43	308.43	41	587.702
60.5	204.206	60.5	215.193	60.5	93.203	61	379.046

Tablo E31. Ay çekirdeği küspesi için farklı spor kons.maksimum enzim üretimi. (Şekil 7.31)

SporKons. (spor/ml)	Amax (μmol/Ldk)
1	404.601
10	465.43
100	513
1000	625.175

Tablo E32. Ay çekirdeği küspesi için farklı spor kons. Ortam pH'sının zamanla değişimi. (Şekil 7.32)

1.10 ⁵		1.10 ⁶		1.10 ⁷		1.10 ⁸	
Zaman (saat)	pH	Zaman (saat)	pH	Zaman (saat)	pH	Zaman (saat)	pH
0	6.67	0	6.67	0	6.67	0	6.67
16	6.11	15.5	6.01	15.5	6.04	15	6.27
24	5.93	23.5	5.96	23.5	6.5	21	6.66
39.5	7.04	39.5	7.4	39.5	7.66	33	7.43
43	7.47	43	7.78	43	7.96	41	7.85
60.5	7.86	60.5	7.95	60.5	8.1	61	8.08

Tablo E33. Ay çekirdeği küspesi için farklı karıştırma hızlarında enzim miktarının zamanla değişimi. (Şekil 7.33)

75 rpm		100 rpm		150 rpm		200 rpm	
Zaman (saat)	Aktivite	Zaman (saat)	Aktivite	Zaman (saat)	Aktivite	Zaman (saat)	Aktivite
0	0	0	0	0	0	0	0
23.5	42.099	15	182.243	15	237.886	17.5	160.492
41	310	22	480.44	21	518.726	25	450
48.5	485.481	38.5	602	33	625.175	43	590
64	236.906	50	244.692	41	587.702	50	223.397
72.5	124.088	-	-	61	379.046	-	-



Tablo E34. Ay çekirdeği küspesi için farklı karıştırma hızlarında maksimum enzim aktiviteleri. (Şekil 7.34)

Karıştırma hızı (rpm)	Amax ($\mu\text{mol/Ldk}$)
75	485.481
100	602
150	625.175
200	590

Tablo E35. Ay çekirdeği küspesi için farklı karıştırma hızlarında ortam pH'sının zamanla değişimi. (Şekil 7.35)

75 rpm		100 rpm		150 rpm		200 rpm	
Zaman (saat)	pH	Zaman (saat)	pH	Zaman (saat)	pH	Zaman (saat)	pH
0	6.67	0	6.67	0	6.67	0	6.67
23.5	6.28	15	6.28	15	6.27	17.5	6.3
41	7.18	22	7.18	21	6.66	25	6.63
48.5	7.1	38.5	7.1	33	7.43	43	8.16
64	7.36	50	7.36	41	7.85	50	7.98
72.5	7.62	-	-	61	8.08	-	-

Tablo E36. Farklı glikoz konsantrasyonlarında enzim üretiminin zamanla değişimi. (Şekil 7.36)

0 g/L glikoz		0.25 g/L glikoz		0.5 g/L glikoz		1 g/L glikoz		2 g/L glikoz	
Zaman (saat)	Aktivite	Zaman (saat)	Aktivite	Zaman (saat)	Aktivite	Zaman (saat)	Aktivite	Zaman (saat)	Aktivite
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	237.886	19	93.264	19	107.398	19	59.674	19	23.0769
21	518.726	37	429.53	37	345.113	37	328.082	37	245.0542
33	625.175	43.5	470.56	43.5	323.236	43.5	382.477	43.5	251.845
41	587.702	58	122.97			58	69.87	58	105.806
61	379.046	-	-	-	-	-	-	-	-

Tablo E37. Farklı yeast ekstrakt konsantrasyonlarında enzim üretiminin zamanla değişimi. (Şekil 7.37)

0 g/L Y.E		1 g/L Y.E		2 g/L Y.E		4 g/L Y.E	
Zaman (saat)	Aktivite	Zaman (saat)	Aktivite	Zaman (saat)	Aktivite	Zaman (saat)	Aktivite
0	0	0	0	0	0	0	0
15	237.886	19.5	61.2338	19.5	87.87	19.5	99.634
21	518.726	36	393.763	36	346.39	36	290.626
33	625.175	44.5	365.394	44.5	301.425	44.5	350
41	587.702	-	-	-	-	54.5	164.748
61	379.046	-	-	-	-	-	-



Tablo E38. Farklı K_2HPO_4 ve KH_2PO_4 konsantrasyonlarında enzim üretiminin zamanla değişimi. (Şekil 7.38)

0 g/L K_2HPO_4 KH_2PO_4		0.25 g/L K_2HPO_4 KH_2PO_4		0.5 g/L K_2HPO_4 KH_2PO_4		1 g/L K_2HPO_4 KH_2PO_4	
Zaman (saat)	Aktivite	Zaman (saat)	Aktivite	Zaman (saat)	Aktivite	Zaman (saat)	Aktivite
0	0	0	0	0	0	0	0
15	237.886	10.5	63.869	16.5	217.426	10	97.0247
21	518.726	18.5	338.989	25	349.885	22.5	376.0459
33	625.175	38.5	244.737	41	116.004	36.5	319.323
41	587.702	-	-	-	-	43	193.196
61	379.046	-	-	-	-	-	-

Tablo E39. Farklı $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ konsantrasyonlarında enzim üretiminin zamanla değişimi. (Şekil 7.39)

0 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$		0.1 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$		0.2 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$		0.4 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	
Zaman (saat)	Aktivite	Zaman (saat)	Aktivite	Zaman (saat)	Aktivite	Zaman (saat)	Aktivite
0	0	0	0	0	0	0	0
15	237.886	10.5	78.516	10.5	62.903	11	28
21	518.726	18.5	307.938	18.5	263.252	19.5	61.121
33	625.175	38.5	224.542	38.5	204	36	293.384
41	587.702	-	-	-	-	44.5	402.774
61	379.046	-	-	-	-	54.5	150.6504